

Katedra: Chemie
Studijní program: Specializace v pedagogice
**Studijní obor
(kombinace):** Chemie se zaměřením na vzdělávání
(CH-HU)

Hodnocení antibakteriálních vlastností materiálů s využitím obrazové analýzy

Evaluation of antimicrobial properties of materials using image analysis

Bakalářská práce:

Autor:
Lucie Kampodoniková

Podpis:



Adresa:
Antonína Sovy 1714
470 01, Česká Lípa

Vedoucí práce: Mgr. Martin Slavík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Irena Horská, Ph.D.

Počet

| stran | grafů | obrázků | tabulek | pramenů | příloh |
|-------|-------|---------|---------|---------|--------|
| 71 | 0 | 53 | 4 | 22 | 0 |

V Liberci dne: 25. 07. 2010

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA PŘÍRODOVĚDNĚ-HUMANITNÍ A PEDAGOGICKÁ

Katedra chemie

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(pro bakalářský studijní program)

pro (kandidát): Kampodoniková Lucie
adresa: Antonína Sovy 1714; 470 01 Česká Lípa
studijní obor (kombinace): Chemie se zaměřením na vzdělávání (CH-HU)
Název BP: **Hodnocení antimikrobiálních vlastností materiálů s využitím obrazové analýzy**
Název BP v angličtině: **Evaluation of antimicrobial properties of materials using image analysis**
Vedoucí práce: Mgr. Martin Slavík, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Irena Šlamborová, Ph.D.
Termín odevzdání:

Poznámka: Podmínky pro zadání práce jsou k nahlédnutí na katedrách. Katedry rovněž formulují podrobnosti zadání. Zásady pro zpracování BP jsou k dispozici ve dvou verzích (stručné, resp. metodické pokyny) na katedrách a na Děkanátě Fakulty přírodovědně-humanitní a pedagogické TU v Liberci.

V Liberci dne 14.12.2009



děkan



vedoucí katedry

Převzal (kandidát): KAMPODONIKOVÁ LUCIE

Datum:

14. 12. 2009

Podpis:



| | |
|----------------|--|
| Název BP: | HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ MATERIÁLŮ S VYUŽITÍM OBRAZOVÉ ANALÝZY |
| Vedoucí práce: | Mgr. Martin Slavík, Ph.D. |
| Cíl: | Otestovat antimikrobiální vlastnosti vybraných materiálů standardními testy s použitím bakteriálních kmenů <i>Escherichia coli</i> a <i>Staphylococcus aureus</i> . S využitím volně dostupného software ImageJ kvantifikovat a zpřesnit měření antimikrobiálních vlastností pomocí analýzy obrazu. Vypracovat metodiku použitelnou v praxi. |
| Požadavky: | Provedení rešerše. Zvládnutí práce se software ImageJ. Naučit se používat mikrobiologické metody. Vypracování metodiky měření antimikrobiálních vlastností. |
| Metody: | Rešerše, překlad, aplikace, hodnocení. Měření plochy halo zón, počítání objektů. |
| Literatura: | Collins, T. ImageJ for Microscopy. [online]. Dostupné z: < http://www.macbiophotonics.ca/imagej >. Cit. 2009-12-14. Rasband, W.S., ImageJ [počítačový program]. Dostupné z < http://rsbweb.nih.gov/ij/ >, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2009. Cit. 2009-12-14. Volně dostupný software pro obrazovou analýzu v Javě Šilhánová, L.: Mikrobiologie. 1. vyd. Praha: Academia, 2002. s.187. ISBN 80-200-0768-7. |

Prohlášení

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

V Liberci dne:

25. 07. 2010

Lucie Kampodoniková

vlastnoruční podpis

..... 

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří se na vzniku práce podíleli. Děkuji členům katedry chemie fakulty přírodovědně-humanitní a pedagogické Technické univerzity v Liberci za pomoc a cenné rady a také za jejich mimořádnou vstřícnost a ochotu. Zejména bych chtěla poděkovat Mgr. Martinovi Slavíkovi, Ph.D. a Mgr. Ireně Šlamborové, Ph.D. za odborné vedení práce a za konzultace, které mi velmi ochotně poskytovali i ve svém volném čase. Můj dík patří také Ing. Janu Grégrovi, který mi vždy ochotně poradil a pomohl.

Děkuji také celé své rodině za podporu, kterou mi po celou dobu poskytovala.

Hodnocení antibakteriálních vlastností materiálů s využitím obrazové analýzy

Resumé

Bakalářská práce se zabývá hodnocením antibakteriálních vlastností materiálů s využitím obrazové analýzy. Popisuje bakteriální růst, kultivaci bakterií, obrazovou analýzu a její využití – popisuje práci s volně dostupným programem ImageJ. Cílem práce je hodnocení antibakteriálních vlastností materiálů s využitím programu ImageJ (analýza účinnosti antibakteriální úpravy textilu).

Evaluation of antimicrobial properties of materials using image analysis

Summary

This bachelor thesis deals with the evaluation of antimicrobial properties of materials using image analysis. It describes bacterial growth, bacterial cultivation, image analysis and its use – also it describes work with freeware ImageJ program. The aim of the bachelor thesis is to analyse evaluation of antimicrobial materials using above mentioned computer program ImageJ.

Einschätzung von antibakteriellen Eigenschaften von Materialien mit Bildanalyse

Zusammenfassung

Die Bachelorarbeit beschäftigt sich mit der Einschätzung von antibakteriellen Eigenschaften von Materialien mit Bildanalyse. Sie beschreibt Bakterienwachsen, Bakterienkultivierung, Bildanalyse und ihre Anwendungen – sie beschreibt Arbeit mit dem Computerprogramm ImageJ, das frei zur Verfügung steht. Ziel dieser Bachelorarbeit ist Einschätzung von antibakteriellen Eigenschaften von Materialien mit dem Computerprogramm ImageJ zu analysieren (die Analyse der Wirksamkeit von antibakteriellen Behandlung von Textilien).

Obsah

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | ÚVOD | 8 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST..... | 10 |
| 2.1 | BAKTERIE | 10 |
| 2.1.1 | <i>Bakteriální buňka – buňka prokaryotní</i> | <i>10</i> |
| 2.1.2 | <i>Bakterie grampozitivní a gramnegativní :</i> | <i>13</i> |
| 2.1.3 | <i>Bakteriální buňka – tvar</i> | <i>15</i> |
| 2.2 | BAKTERIE POUŽITÉ V PRAKTICKÉ ČÁSTI | 16 |
| 2.2.1 | <i>Escherichia coli (E. coli)</i> | <i>16</i> |
| 2.2.2 | <i>Staphylococcus aureus (S. aureus)</i> | <i>17</i> |
| 2.3 | RŮST A KULTIVACE BAKTERIÍ | 18 |
| 2.3.1 | <i>Fáze růstu bakterií.....</i> | <i>18</i> |
| 2.3.2 | <i>Faktory ovlivňující růst bakterií</i> | <i>20</i> |
| 2.3.3 | <i>Kultivace bakterií.....</i> | <i>25</i> |
| 2.4 | OBRAZOVÁ ANALÝZA | 29 |
| 2.4.1 | <i>Vytvoření obrazového záznamu</i> | <i>30</i> |
| 2.4.2 | <i>Počítačem podporovaná analýza obrazu a analýza vybraných (charakteristických) rysů obrazu</i> | <i>34</i> |
| 2.5 | IMAGEJ | 35 |
| 2.5.1 | <i>Představení hlavní nabídky programu ImageJ</i> | <i>35</i> |
| 3 | PRAKTICKÁ ČÁST | 41 |
| 3.1 | PŘÍPRAVA INOKULA | 42 |
| 3.1.1 | <i>Princip ředění</i> | <i>42</i> |
| 3.1.2 | <i>Postup:</i> | <i>42</i> |
| 3.2 | HODNOCENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍCH ÚPRAV - VÝSLEDKY ZÍSKANÉ METODOU AATCC METHOD 100 – AN AMERICAN STANDARD 1993..... | 43 |
| 3.2.1 | <i>Postup:</i> | <i>43</i> |
| 3.2.2 | <i>Zjištění počtu bakteriálních kolonií:</i> | <i>44</i> |
| 3.2.3 | <i>Výsledky práce s programem ImageJ:</i> | <i>47</i> |
| 3.3 | HODNOCENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍCH ÚPRAV - VÝSLEDKY ZÍSKANÉ METODOU AATCC METHOD 147..... | 52 |
| 3.3.1 | <i>Postup:</i> | <i>52</i> |
| 3.3.2 | <i>Měření halozón pomocí programu ImageJ.....</i> | <i>54</i> |
| 3.3.3 | <i>Výsledky:</i> | <i>55</i> |
| 3.4 | HODNOCENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍCH ÚPRAV - VÝSLEDKY ZÍSKANÉ ÚPRAVOU POSTUPU METODY AATCC METHOD 147 | 57 |
| 3.4.1 | <i>Postup:</i> | <i>57</i> |
| 3.4.2 | <i>Stěr.....</i> | <i>58</i> |
| 3.4.3 | <i>Otisk:</i> | <i>61</i> |
| 3.4.4 | <i>Srovnání výsledků získaných otiskem a stěrem z plochy pod testovaným vzorkem:</i> | <i>64</i> |
| 4 | ZÁVĚR: | 65 |
| 5 | SEZNAM POUŽITÝCH POJMŮ | 67 |
| 6 | SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ..... | 68 |
| 7 | SEZNAM OBRÁZKŮ:..... | 70 |

1 Úvod

Bakterie jsou organismy, které tvoří rozsáhlou skupinu a na naší planetě se vyskytují už velice dlouho – „*Vesmír vznikl velkým třeskem před asi 18 miliardami let. Teprve před 4,5 miliardami let vznikla naše Země. Kupodivu již za 1 miliardu let po vzniku Země, tedy před 3,5 miliardami let se na ní objevily první prokaryontní buňky.*¹

Lze říci, že se vyskytují na celé naší planetě. Vysoká odolnost bakterií umožňuje jejich existenci i v oblastech, kde je život jiných forem nemožný – mají schopnost odolávat extrémním podmínkám, kterými jsou například mrazy Antarktidy, velmi vysoká teplota horkých pramenů nebo pH solných jezer. Odolnost bakterií vůči nepříznivým podmínkám prostředí umožňuje rozšíření těchto organismů opravdu po celé Zemi. „*Není asi místa na naší planetě, kde by nebyly bakterie. Nejvíce je jich v půdě a ve vodě, velmi mnoho jich je v tělech a na tělech jiných organismů, rostlin, živočichů i člověka, a mnoho je jich ve vzduchu, jehož prostřednictvím se šíří. Váhou představují asi polovinu živé hmoty na Zemi.*“²

Bakterie se podílí na koloběhu hmoty na naší planetě a zaujímají na Zemi nepostradatelné postavení. „*Jestliže hlavním rysem funkce rostlin v biosféře je tvorba organických látek z látek anorganických za spotřeby energie světelné, hlavním rysem funkce bakterií v přírodě je mineralizace látek organických na anorganické za uvolnění tepla. Životní činnost živočichů je podmíněna životní činností rostlin a životní činnost rostlin je podmíněna životní činností bakterií.*“³

Bakterie mají tedy v přírodě kladný, důležitý význam. Člověk využívá mikroorganismů (jejich životních činností) také pro svou vlastní potřebu.

¹ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 23. ISBN: 80-901521-4-7.

² BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 26. ISBN: 80-901521-4-7.

³ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 26. ISBN: 80-901521-4-7.

Příkladem je výroba alkoholických nápojů, výroba sýrů, konzervace potravin, výroba kysaných nápojů z mléka, výroba kyselého zelí atd.

Ovšem ve vztahu ke konkrétnímu makroorganismu (př.: lidské tělo) se bakterie mohou chovat také negativně (parazitismus = jednostranný vztah využívání partnera). „*Proniknutí bakterie do vnitřního prostoru makroorganismu, pomnožení se v něm, nazýváme infekcí.*“⁴ Bakterie mohou poškodit makroorganismus (hostitele) jen za určitých podmínek. „*Např. Escherichia coli je součástí normální střevní flóry a neškodí, přenesena do močových cest (např. katetrizací) vyvolává zánět močového měchýře nebo vyšších úseků močového traktu.*“⁵ Negativní působení bakterií na organismus je důvodem vzniku mnoha výzkumů, které se zabývají látkami s antibakteriálními účinky, kterými jsou desinfekční látky, antiseptika a antibiotika, a jejich možnou aplikací na různé materiály (například antibakteriálních úprav textilií používaných v lékařství).

Cílem práce je zhodnotit účinnost běžně používaných antibakteriálních úprav za použití metod AATCC Method 147 – An American National Standard 1993 a AATCC Method 100 – An American Standard 1993 a vyhodnocení výsledků s využitím obrazové analýzy, použití programu ImageJ. Při zjišťování a hodnocení účinnosti antibakteriálních vlastností jsou používány bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*.

⁴ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 27 ISBN: 80-901521-4-7.

⁵ LOBOVSKÁ, Alena. *Infekční nemoci*. Vydání první. Praha : Karolinum, 2002. Obecná část, s. 264. ISBN 80-246-0116-8.

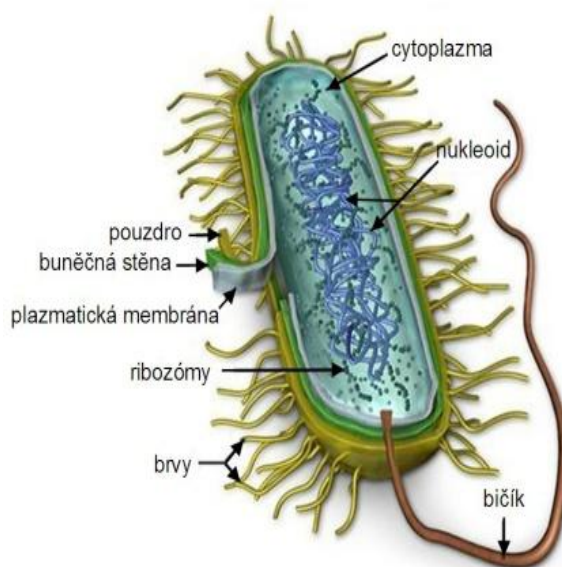
2 Teoretická část

2.1 Bakterie

„Mezi dnešními buňkami mají bakterie nejjednodušší strukturu a nejvíce se přibližují ukázce života v jeho nejzákladnější variantě. Jsou to obvykle kulovité, okrouhlé nebo spirálovité buňky několik mikrometrů dlouhé. Často mají tuhý ochranný plášť, zvaný buněčná stěna, pod níž cytoplazmatická membrána uzavírá jediný oddíl obsahující cytoplazmu včetně DNA.“⁶

2.1.1 Bakteriální buňka – buňka prokaryotní

Bakterie jsou organismy, které jsou spolu se sinicemi řazeny pro jejich buněčnou strukturu do skupiny PROKARYOTA. Nejvýraznějším odlišením stavby prokaryotní buňky a buňky eukaryotní je strukturní organizace buněčného jádra. Jádro v prokaryotní buňce není odděleno od cytoplazmy membránou. Rozdílů ve stavbě prokaryotní buňky je ovšem více:



Obr. 1 Prokaryotní buňka

(Dostupný z: <http://www.sszdra-karvina.cz/bunka/bi/02pro/prot2.htm>)

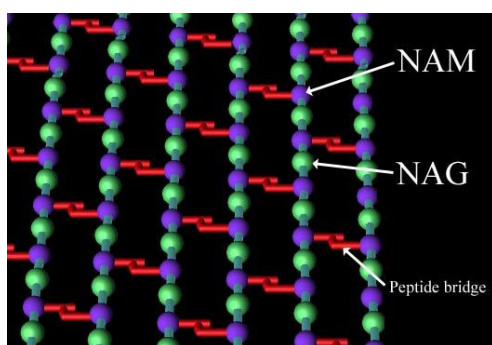
⁶ ALBERTS, Bruce. *Základ buněčné biologie : úvod do molekulární biologie buňky*. Vydání druhé. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 2005. 25 s. ISBN 80-902906-2-0.

- buněčné jádro prokaryotní buňky je tvořeno pouze jednou molekulou DNA (dvojitá molekula uzavřená do kruhu)
- prokaryotní buňka je haploidní – nikdy nedochází ke splynutí buněk v diploidní zygotu (množí se tedy pouze nepohlavně)
- odlišnost ribozomů (funkční, stavební vlastnosti)
- v prokaryotní buňce nejsou přítomny buněčné organely (neobsahuje mitochondrie, chloroplasty, endoplasmatické retikulum – neobsahuje žádné jiné buněčné organely)

Prokaryotní buňka se od buňky eukaryotní odlišuje mnoha dalšími specifickými vlastnostmi, které ovšem nemusí platit ve všech případech. Mezi tyto vlastnosti patří velikost buňky – kdy velikost prokaryotní buňky je asi desetkrát menší. Velikostně je buňka prokaryot srovnatelná s mitochondrií. „Zatímco např. jaterní buňka je přibližně krychle o straně 20 μm , je *Escherichia coli* tyčinka o tloušťce 1 μm a délce 2 μm , a *Staphylococcus aureus* kulička o průměru 1 μm .“⁷

Prokaryotní buňka nemá odlišnou pouze velikost, ale také její chemické složení je jiné. V buněčné stěně prokaryotní buňky je na rozdíl od eukaryot přítomen **peptidoglykan** (speciální heteropolymer polysacharidového typu, zvaný též **mukopeptid** nebo **murein**). Vrstva peptidoglykanů zajišťuje pevnost buněčné stěny bakterií.

PEPTIDOGLYKAN



Struktura peptidoglykanu je tvořena rovnoběžnými, dlouhými vlákny glykanu spojená peptidickými vazbami.

Vlákna glykanu se skládají ze dvou látek:

N-acetylglukosaminu (NAG)

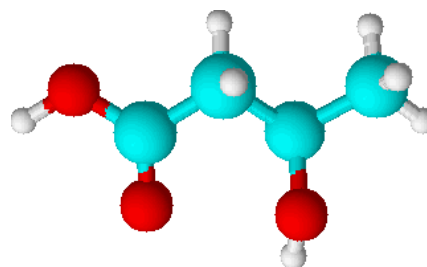
kyselina muranová (NAM)

Obr. 2 Peptidoglykan

(Dostupný z: <http://home.icpf.cas.cz/gavlasova/Mikrobiologie/01%5B1%5D.ppt>)

⁷ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 35 ISBN: 80-901521-4-7.

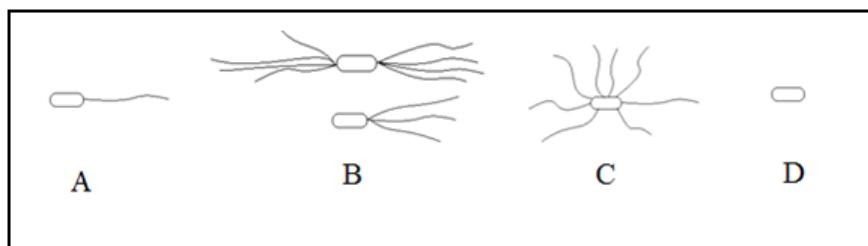
Další odlišností chemického složení je zcela výjimečná přítomnost sterolů v buněčné membráně prokaryot (typická pro eukaryotní buňku). Naopak schopnost řady prokaryontních druhů vázat vzdušný dusík - to je něco, co je zcela neznámé ve světě eukaryot stejně jako tvorba kyseliny poly - β - hydroxymáselné, jako zásobního buněčného materiálu.



Obr. 3 kyselina poly - β - hydroxymáselná

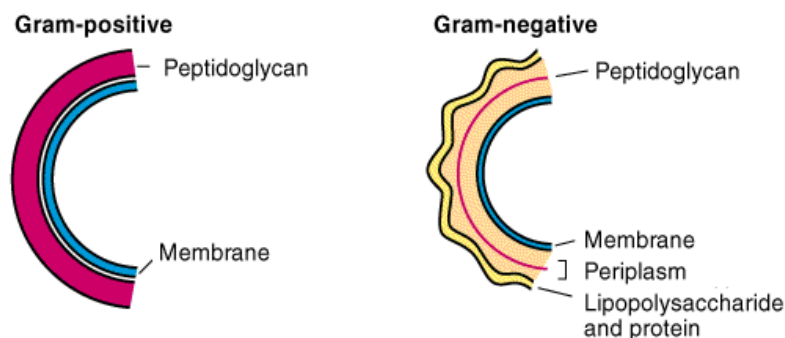
Také bičíky prokaryotní buňky se liší - rozdíl je v jednoduchosti stavby bičíků u prokaryot. Bakterie se dělí do skupin podle počtu a umístění bičíků:

- A) ***monotricha*** – bakterie s 1 bičíkem na jednom nebo obou pólech buňky
- B) ***lofotricha*** – bakterie se svazkem bičíků na jednom pólu buňky
- C) ***peritricha*** – bakterie, která má celý povrch buňky pokryt bičíky
- D) ***atricha*** – bakterie bez bičíků



Obr. 4 Dělení bakterií podle počtu a umístění bičíků

2.1.2 Bakterie grampozitivní a gramnegativní:



Obr. 5 Buněčná stěna grampozitivních a gramnegativních bakterií
(Dostupný z: <http://home.icpf.cas.cz/gavlasova/Mikrobiologie/01%5B1%5D.ppt>)

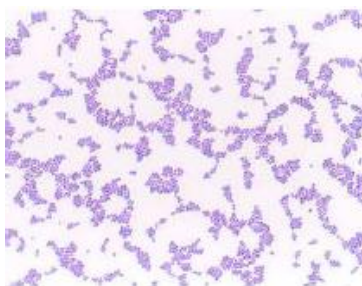
Podle složení buněčné stěny jsou bakterie děleny na dvě skupiny – bakterie grampozitivní a bakterie gramnegativní. Pojmenování skupin je odvozeno od metody použité k obarvení bakteriálních buněk pomocí Gramova barvicího roztoku.

„V době zlatého věku bakteriologie přispěl k jejímu rozvoji významnou měrou i dánský mikrobiolog Christian Gram. Při hledání způsobu, jak diferenciatně obarvit bakterie v živočišné tkáni, popsal v roce 1884 způsob, který je dodnes používán, i když k jiným účelům, a kterým se nazývalo Gramovo barvení bakterií. Spočíval v obarvení preparátu tkáně obsahující bakterie krystalovou violetí a následném působení Gramova jodového roztoku (vodný roztok jodu a KI). Vzniká komplex zabarvující preparát intenzivně modrofialově. Když pak Gram působil na takový preparát vhodnou dobu etanolem nebo acetonem nebo jiným organickým rozpouštědlem, došlo k odbarvení tkáně dříve než bakterií, takže bakterie se objevily modrofialové na žlutém pozadí tkáně. Gram však nakonec považoval výsledek svého hledání za neúspěch, protože některé bakterie se etanolem odbarvovaly spolu s tkání. Brzo po té však byla Gramova barvicí metoda použita znovu, tentokrát k diferenciaci mezi bakteriemi, a od té doby dodnes rozlišujeme dva typy bakterií: grampozitivní, které modrofialové barvivo působením etanolu neztrácejí a zůstávají modré, a gramnegativní, jt. ty, které se etanolem odbarvují, a které je možno po odbarvení znovu obarvit např. safraninem, takže jsou pak např. červené.“⁸

⁸ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 19-20. ISBN: 80-901521-4-7.

Grampozitivní bakterie

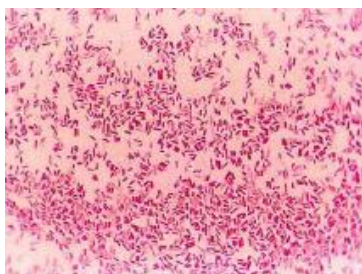
Buněčná stěna grampozitivních bakterií je tlustá – silná peptidoglykanová vrstva, která je vyplněna tzv. teichoovou kyselinou, která tvoří až 50% sušiny buněčné stěny grampozitivních bakterií. Stěna těchto bakterií neobsahuje téměř žádné lipidy. Peptidoglykan v buněčné stěně je působením alkoholu dehydratován a tím dochází ke snížení propustnosti stěny – komplex Gramova barviva tedy není vyplavován.



Obr. 6 Gramovo barvení - staphylococcus aureus
(Dostupný z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MB/2.pdf>)

Gramnegativní bakterie

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je tvořena tenkou peptidoglykanovou vrstvou, která neobsahuje kyselinu teichoovou, a tzv. vnější membránou, která obsahuje fosfolipidy, lipoproteiny, polysacharidy, strukturní a enzymové proteiny – prostor mezi vrstvami se nazývá periplazmatický prostor. „*Stěny gramnegativních bakterií teichoovou kyselinu neobsahují, což je zřejmě – spolu s poměrně tenkou vrstvou peptidoglykanu – příčinou vyplavování komplexu Gramova barviva z buňky působením acetonu nebo ethanolu.*“⁹ Podstatnou částí buněčné stěny gramnegativních bakterií jsou lipidy, které způsobují vyšší odolnost k aniontovým povrchově aktivním látkám (mýdlo, žlučové kyseliny apod.). Gramnegativní bakterie se díky této odolnosti ke žlučovým kyselinám mohou vyskytovat ve střevním traktu živočichů - Escherichia coli.



Obr. 7 Gramovo barvení - E.Coli
(Dostupný z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MB/2.pdf>)

⁹ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. Morfologie, cytologie a způsoby rozmnožování mikroorganismů, s. 33. ISBN 80-200-1024-6.

2.1.3 Bakteriální buňka – tvar

Bakteriální buňky nejsou svým tvarem příliš rozmanité, v morfologii buněk jednotlivých druhů nejsou velké rozdíly. Mezi nejčastější tvary buněk bakterií patří tyčinkovitý nebo kulovitý. Dalším typem je vláknitý tvar – *vláknitý tvar se vyskytuje u poměrně rozsáhlé skupiny půdních bakterií patřících do řádu Actinomycetales a u několika dalších druhů*¹⁰.

Tyčinkovité buňky

Tyčinkovité buňky jsou:

- a) rovné
- b) zakřivené
- c) tvaru pravidelné spirály
- d) tvaru nepravidelné dlouhé spirály

Dalším faktorem lišícím se u různých druhů bakterií je poměr šířky a délky tyčinky. Nejčastěji je délka buněk 1 - 3 μm a šířka 0,5 – 1,5 μm. Tyčinkovité buňky mohou být velmi krátké, podobné kokům – jsou to především buňky s intenzivnějším rozmnožováním. Naopak se ovšem vyskytují také druhy, které tvoří dlouhé tyčinky podobné krátkým vláknům – typické pro klidové buňky.

Kulovité buňky(koky)

Kulovité bakterie se liší uspořádáním buněk, které je dáno dělením buňky při rozmnožování – buňky tvoří:

- a) řetízky – dělení buněk pouze v jedné rovině
- b) tetrády – dělení buněk ve dvou na sebe kolmých rovinách
- c) sarciny – dělení ve třech na sebe kolmých rovinách (tvoří pravidelné balíčky po osmi až několika stech buňkách)
- d) nepravidelné shluky buněk – dělení buněk v různých rovinách

Vláknité buňky

Bakterie je charakteristické pravé větvení. Rozmnožování probíhá dělením buněk ve vláknech (rozmnožování vláken), tvorbou jednobuněčných útvarů (spor) a rozpadem vláken.

¹⁰ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. Morfologie, cytologie a způsoby rozmnožování mikroorganismů, s. 29. ISBN 80-200-1024-6.

2.2 Bakterie použité v praktické části

2.2.1 Escherichia coli (E. coli)

E. coli je gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie. E. coli je přirozenou součástí střevní mikroflóry. „*Mikroflóra trávicího traktu představuje komplexní, vyvážený mikrobiální ekosystém.*“¹¹ Tato bakterie je běžným komensálem tlustého střeva – jejím hlavním významem pro organismus je produkce vitamínu K potřebného pro správnou srážlivost krve. Avšak některé mutace E. coli mohou působit na organismus jako patogeny, které způsobují nejčastěji průjemová onemocnění dětí i dospělých.

„*Patogenita Escherichia coli vyvolává 2 typy onemocnění:*

- a) *extraintestinální (zejména močových cest, septická onemocnění, infekce ran, hnisavé procesy)*
- b) *v intestinálním traktu infekce provázané průjmy (určité kmeny).*“¹²

E.coli je jedna z nejčastěji zkoumaných bakterií „*Z celého světa bakterií se stal středem zájmu molekulární biologie především jeden druh: Escherichia coli, zkráceně E. coli. Tato malá tyčinkovitá eubakteriální buňka normálně žije ve střevě lidí a ostatních obratlovců; lze ji však pěstovat na jednoduché směsi živin v kultivační nádobě. E. coli se umí přizpůsobit různým chemickým podmínkám ve svém prostředí a rychle se množí. Její genetické instrukce jsou obsaženy v jediné molekule DNA a představují informaci asi o 4000 různých druhů proteinů. Pro srovnání, lidská buňka obsahuje 600krát více DNA, která kóduje 50 000 – 100 000 druhů proteinů.*

Na moderní úrovni rozumíme fungování E. coli mnohem kompletněji než fungování jiného živého organismu. Většina našich znalostí základních metabolismů života, jakými jsou replikace DNA či dekódování genetické informace, pochází ze studia E. coli. Následný výzkum potvrdil, že v našich

¹¹ ZBOŘIL, Vladimír. *Mikroflóra trávicího traktu : klinické souvislosti*. Vydání první. Praha : Grada Publishing, 2005. 155 s. ISBN 80-247-0584-2.

¹² BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 264. ISBN: 80-901521-4-7.

*vlastních buňkách se tyto děje odehrávají stejným způsobem jako v buňkách E. coli.*¹³

V mnoha výzkumech dnešní doby pracují odborníci právě s touto bakterií. Aktuálním tématem současnosti je například získání bionafty, kdy enzymy produkované E. coli štěpí celulózu za vzniku bionafty. Tímto tématem se zabývá dnes mnoho odborných článků – například článek Bionafta z bakterií dubnového vydání (rok 2010) časopisu Scientific American nebo článek publikované na internetových stránkách www.sciencedaily.com (článek je k dispozici na <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/01/080106202952.htm>).

2.2.2 Staphylococcus aureus (S. aureus)

Staphylococcus aureus je grampozitivní kulovitá bakterie, která se často vyskytuje u lidí i řady zvířat. Vyskytuje se zejména na kůži a sliznicích. „*S. aureus je patogenní pro člověka a prakticky pro všechny teplokrevné živočichy. Lidský organismus je vůči stafylokokové infekci značně odolný. K onemocnění dochází zpravidla při oslabení organismu nebo při infekci velkou dávkou virulentního kmene. Výrazným predisponujícím faktorem může být chirurgický zákrok, úraz, umělá náhrada, zavedený katetr, diabetes, maligní onemocnění nebo imunologická nedostatečnost. Více ohroženi jsou také nedonošení novorozenci, kojenci a starci.*“¹⁴ Stafylokokové infekce se nejčastěji projevují jako onemocnění kůže.

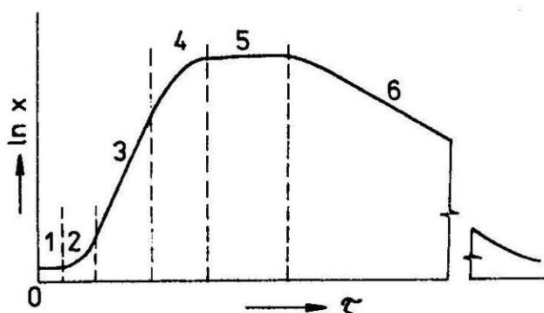
¹³ ALBERTS, Bruce. *Základ buněčné biologie : úvod do molekulární biologie buňky*. Vydání druhé. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 1998. 25 s. ISBN 80-902906-2-0.

¹⁴ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 197. ISBN: 80-901521-4-7.

2.3 Růst a kultivace bakterií

2.3.1 Fáze růstu bakterií

Bakterie se za optimálních podmínek rozmnožují velmi rychle. „Průměrná generační doba většiny bakterií, tj. doba, za kterou se zdvojnásobí počet buněk v kultuře, je za optimálních podmínek kolem 20 minut. Při této rychlosti růstu by z jediné buňky vzniklo za 48 hodin 2^{144} čili $2,5 \times 10^{43}$ buněk, což představuje zhruba 4000násobek hmoty zeměkoule. Toto obrovské množení buněk nemůže nikdy vzniknout, neboť dostupné živiny se poměrně brzy vyčerpají a produkty metabolismu se hromadí v takových koncentracích, které již dalšímu rozmnožování mikroorganismů zabráňují. Maximální dosažitelná koncentrace živých buněk v 1 ml růstového prostředí je u bakterií v řádu 10^9 .“¹⁵



Obr. 6.1 Růstová křivka

τ – doba (h)

x – počet živých buněk v 1 ml

1 – lag-fáze

2 – fáze zrychlujícího se růstu

3 – exponenciální fáze růstu

4 – fáze zpomalujícího se růstu

5 – stacionární fáze růstu

6 – fáze odumírání

Obr. 8 Růstová křivka

(ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. 3. Praha : Academia, 2002. Dynamika růstu a množení, s. 240. ISBN 80-200-1024-6.)

Bakterie nedosahují při rozmnožování ihned maximální růstové rychlosti. Vzrůst počtu živých buněk v čase lze graficky znázornit vynesáním času na vodorovnou osu x a logaritmu počtu živých buněk v 1 ml. Vynesáním koncentrace buněk či biomasy v závislosti na čase, je dostána funkční závislost nazývaná růstová křivka bakterií.

Na růstové křivce lze pozorovat několik úseků (fází růstu). Již v roce 1909 byly na růstové křivce rozlišeny 4 růstové fáze (lag-fáze, exponenciální fáze, stacionární fáze, fáze odumírání), které jsou rozlišovány dodnes.

Lag-fáze – v počáteční fázi, tzv. lag-fázi (přípravné fázi) bakterie nepřibývají. Buňky se nerozmnožují, ale zvětšuje se jejich objem a jejich enzymový systém je

¹⁵ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. Dynamika růstu a množení, s. 239. ISBN 80-200-1024-6.

aktivován („např. se syntetizují indukovatelné enzymy nutné pro využití přítomných substrátů“¹⁶).

Délka fáze je u jednotlivých druhů mikroorganismů různá.

„Např. u *Escherichia coli* se může doba lag – fáze pohybovat v rozmezí 30 minut až 3 hodin. Jestliže růstové prostředí obsahuje živiny vyhovující jen malému podílu inokula (tj. jen malému počtu mutantů), trvá lag – fáze mimořádně dlouho, neboť zahrnuje také selekci těchto mutantů a odumírání ostatních buněk inokula.“¹⁷

Exponenciální fáze – je charakterizována intenzivním růstem buněk. Generační doba buněk je v této fázi nejkratší a po celou dobu této fáze zůstává konstantní. Koncentrace je exponenciální funkcí času. Například z jediné buňky *E.coli* o živé hmotnosti 10^{-12} g by mohlo teoreticky vzniknout po 24 hodinách kultivace 280 g biomasy (při době zdvojení 0,5 hodiny), a po dalších 24 hodinách 19 milionů tun biomasy. Tolik biomasy ovšem nevznikne a to proto, že po exponenciální fázi, nastává vždy fáze stacionární.

(Exponenciální fázi předchází přechodná fáze zrychlujícího se růstu a naopak po ukončení exponenciální fáze nastává přechodná fáze zpomalení růstu).

Stacionární fáze – v této fázi je zastaven přírůstek živých buněk. Bakterie v této fázi nepřibývají ani neubývají. Příčiny přechodu do stacionární fáze mohou být dvě. Je to vyčerpání jedné z živin, které je důležitější, obvyklejší a dobře analyzovatelné. Nebo je zastavení růstu způsobeno nahromaděním toxických zplodin metabolismu. „Patří sem zvýšená koncentrace neúplně oxidovaných uhlikatých sloučenin, nečastěji různých alkoholů a organických kyselin. S tvorbou kyselin souvisí pokles pH, který bývá častou příčinnou zastavení růstu.“¹⁸

Fáze odumírání – je poslední fází, v které bakterie hynou a dochází k poklesu jejich koncentrace.

¹⁶ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. Dynamika růstu a množení, s. 239. ISBN 80-200-1024-6.

¹⁷ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. Dynamika růstu a množení, s. 239. ISBN 80-200-1024-6.

¹⁸ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 67. ISBN: 80-901521-4-7.

2.3.2 Faktory ovlivňující růst bakterií

Rozmnožování bakterií je závislé na vnějším prostředí. Je mnoho faktorů, které silně ovlivňují životní činnost a vývoj mikroorganismů. Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující růst bakterií patří teplota, pH a tlak. Růst bakterií ovlivňuje mnoho dalších faktorů – např. výživa, povrchové napětí, záření, elektrický proud a mnoho dalších.

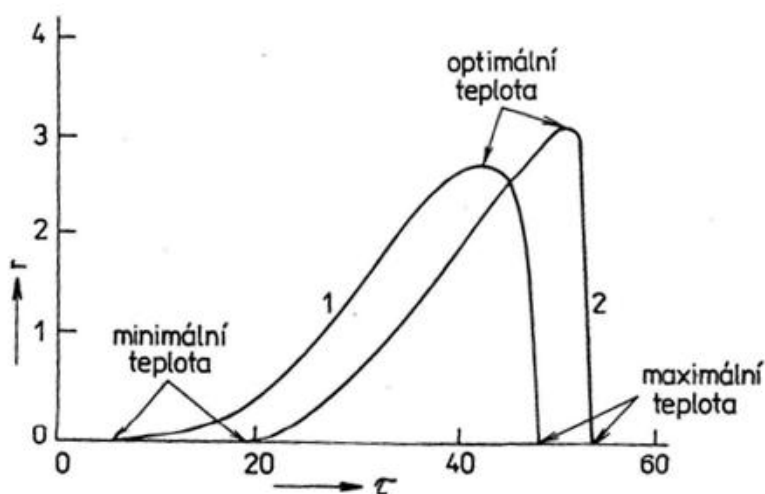
2.3.2.1 TEPLOTA

Teplota vnějšího prostředí patří mezi hlavní faktory, které ovlivňují rychlost rozmnožování bakterií. U jednotlivých druhů mikroorganismů jsou rozlišovány tři základní body (stupně) teploty:

Minimální teplota – nejnižší teplota, při které se daný druh rozmnožuje (rychlost rozmnožování je ještě zjistitelná)

Optimální teplota – teplota, při které se daný druh rozmnožuje největší rychlostí

Maximální teplota – nejvyšší teplota, při které se daný druh rozmnožuje



Obr. 9 Vliv teploty na rychlost rozmnožování (1 – *E. coli*)

(ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila . *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. 3. Praha : Academia, 2002. Dynamika růstu a množení, s. 166. ISBN 80-200-1024-6.)

Základní teplotní body různých druhů bakterií se liší, a proto je dělíme do tří hlavních skupin:

- 1) Psychofilní mikroorganismy - optimální teplota bakterií je mezi 20 – 30 °C, tyto organismy rostou ještě při teplotě 0 °C.
- 2) Mezofilní mikroorganismy - optimální teplota bakterií je mezi 30 - 40 °C
- 3) Termofilní mikroorganismy - optimální teplota bakterií je vyšší než 45 °C

Bakterie mají různý teplotní rozsah a v tomto teplotním rozmezí jsou schopny existence. Překročení těchto teplot vede k usmrcení. Smrtící účinky jsou kvalitativně vyjádřeny letální teplotou. Letální teplota je nejnižší teplota, při níž je organismus za přísně definovaných podmínek usmrcen během určité doby, obvykle 10 minut. „Hlavní příčinou letálních účinků vysokých teplot je pravděpodobně nevratná denaturace bílkovin a z ní plynoucí inaktivace enzymů, avšak probíhají zde i jiné procesy, jako např. poškození cytoplazmatické membrány, jež vede k lýze buněk.“¹⁹ Nízkým teplotám odolávají bakterie mnohem lépe než teplotám vysokým. „Působení nižších teplot je složitější a obvykle není letální. Většina mikroorganismů je schopna přežít dlouhou dobu při teplotě nižší než je jejich minimální teplota růstu, pouze se nerozmnožují. Působení teplot pod bodem mrazu závisí na rychlosti ochlazení. Čím pomalejší ochlazení, tím vznikají větší krystalky ledu a tím větší je poškození buněčné struktury. I při nejpomalejším ochlazení ale nikdy nezabijeme všechny jedince. Ochlazování není proto vhodná sterilizační metoda. Provedeme-li zmrazení rychle a na hlubokou teplotu, většina populace sice zmrzne, ale přežije. Toho se také využívá při dlouhodobém uchovávání kultur ve zmrazeném stavu.“²⁰

2.3.2.2 pH

Hodnota pH má výrazný vliv na růst bakterií. Rozmnožování jednotlivých druhů bakterií je možné pouze v určitém rozmezí pH. Bakterie mají spolu s kvasinkami rozmezí pH pro optimální růst poměrně úzké, na rozdíl od většiny plísní. Většina bakterií se rozmnožuje v neutrálním nebo slabě zásaditém prostředí. V kyselém prostředí většina bakterií nežije, výjimkou jsou ovšem střevní bakterie, které musí odolávat pH žaludečních šťáv, které je velmi nízké.

¹⁹ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy, s. 170. ISBN 80-200-1024-6.

²⁰ *Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem* [online]. 2009 [cit. 2010-07-09]. Fakulta životního prostředí. Dostupné z WWW: <<http://fzp.ujep.cz/~trog/6Fyziologie.pdf>>.

2.3.2.3 TLAK

Většina bakterií se rozmnožuje za normálního tlaku. Zvýšení tlaku působí často negativně. Zvýšení tlaku na 10 až 20 MPa vede většinou ke zpomalení rozmnožování bakterií a zvýšení na 30 až 40 MPa k jeho úplnému zastavení. Existují ovšem výjimky. Barofilní (barotolerantní) bakterie jsou mikroorganismy schopné se rozmnožovat i hluboko na mořském dně, kde je hydrostatický tlak 60 MPa. „*Mechanismus nepříznivého účinku vysokých tlaků nebyl dosud vysvětlen. Předpokládá se, že vysoký tlak působí nepříznivě především na syntézu buněčné stěny. Bylo také zjištěno, že tlak 5 až 60 MPa způsobuje anomálie v dělení buněk (tvoří se dlouhá vlákna), neboť se zastaví replikace DNA.*“²¹

2.3.2.4 PŮSOBENÍ ANTIMIKROBÁLNÍCH LÁTEK

V prostředí mohou být přítomny některé látky, které svým chemickým složením působí negativně na růst a rozmnožování bakterií. Tyto látky se dělí do dvou velkých skupin:

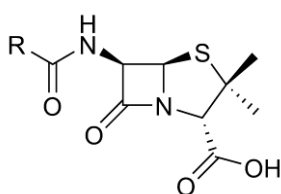
- 1) Bakteriostatické látky – zastavují rozmnožování bakterií
- 2) Baktericidní – usmrcují bakterie

Antimikrobální látky jsou chemicky velmi rozmanité. Lze je dělit podle primárního účinku do tří základních skupin:

- a) Látky, které poškozují určitou strukturu buňky (např. buněčnou stěnu)
- b) Látky, které působí na mikrobiální enzymy
- c) Látky, které reagují s DNA

Látky, které poškozují určitou strukturu buňky

Mezi sloučeniny poškozující pouze určitou strukturu patří např. penicilin,



který poškozuje buněčnou stěnu nebo její syntézu. Toto antibiotikum inhibuje syntézu peptidoglykenů, proto působí především na grampozitivní bakterie.

Obr. 10 Penicilin

(Dostupný z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Penicillin-core.png>)

²¹ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy, s. 183. ISBN 80-200-1024-6.

Mnoho látek s antibakteriálními účinky poškozuje cytoplazmatickou membránu. „*Ke sloučeninám poškozujícím přednostně cytoplazmatickou membránu nebo její funkce patří rozpouštědla tuků (chloroform, aceton, diethyether), anioaktivní tenzidy (mýdla, syntetické tenzidy), polypeptidová antibiotika produkovaná příslušníky rodu Bacillus, fenoly a látky působící na bílkoviny, tj. formaldehyd, silná oxidační činidla (Cl_2 , I_2 , Br_2 , H_2O_2 , $KMnO_4$) a silná redukční činidla (např. SO_2).*“²²

Látky, které působí na mikrobiální enzymy

Do této skupiny látek lze také řadit silná oxidační a redukční činidla - tyto látky narušují bílkoviny. Účinek oxidačních a redukčních činidel spočívá v jejich působení na aktivní – SH skupiny enzymů a následné změně poměru –SH a –S–S– skupin v bílkovinách. Na skupinu –SH působí také ionty těžkých kovů (Ag, Pb, Cu, Hg), organické sloučeniny těžkých kovů (např. organoměďnaté sloučeniny), alkylační činidla (např. kyselina monojodoctová) a nenasyčené sloučeniny (např. kyselina sorbová).

„*Inhibici enzymových reakcí způsobují také specifické antimetabolity neboli antagonisté metabolismu, což jsou v podstatě analogy substrátů nebo koenzymů jednotlivých enzymů. Antimetabolity soutěží se substrátem nebo koenzymem o příslušné aktivní místo enzymu a z tohoto místa mohou být uvolněny nadbytkem látky, jejímž jsou analogem. Protože tedy působí vratně, jsou pouze mikrobistatickými látkami. Důležitými antimetabolity jsou sulfonamidy, které jsou velmi významnými léky.*“²³

Látky, které reagují s DNA

Do této skupiny patří chemické mutageny. „*Mutace jsou dědičné změny genomu vedoucí ke změněné funkci jeho složek a tím i ke změně fenotypu buňky – vitální mutace, nebo k zahynutí – letální mutace.*“²⁴ Chemickými mutageny jsou deaminační činidla (např. HNO_2) nebo silná alkylační činidla, z nichž nejdůležitějším je ultrafialové světlo. Nukleové kyseliny pohlcují nejvíce UV záření o vlnové délce 257 – 265 nm. Pohlcování UV záření zabraňuje replikaci DNA.

²² ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy, s. 185. ISBN 80-200-1024-6.

²³ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila . *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy, s. 186. ISBN 80-200-1024-6.

²⁴ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 127 ISBN: 80-901521-4-7.

2.3.2.5 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY V TEXTILNÍM PRŮMYSLU

Antimikrobiálních vlastností některých látek se využívá především k výrobě vláken, které nacházejí své uplatnění jako technické textilie v medicíně. Existuje mnoho bakterií, které nemají patogenní účinky, ovšem existuje také bakterie, které při přemnožení mohou způsobovat zdravotní potíže. Antimikrobiální úpravy vláken se dělí, stejně jako antimikrobiální látky, na dvě skupiny – bakteriostatické úpravy (růst bakterií je inhibován) a úpravy baktericidní (bakterie jsou usmrceny).

„Jako antibakteriální prostředky se používají:

- *kovy a kovové sloučeniny (stříbro, měď, zinek, kysličníky, sulfáty kovů, keramika s obsahem kovů);*
- *kvartérní amoniové soli;*
- *N-fenylamidy;*
- *živočišné polysacharidy (chitin, chitosan);*
- *estery mastných kyselin;*
- *fenolické sloučeniny (chloroxifenol) ;*“²⁵

Podle působení lze antibakteriální látky dělit do dvou skupin:

1) Látky postupně rozpustné ve vodě

Do této skupiny patří kovové soli a kovy – antibakteriální účinek je vyvolán kationtem kovu. *„V případě látek postupně rozpustných ve vodě dochází k pronikání kationtů kovů dovnitř buněk a vazbě na –SH skupinu enzymů, což způsobí snížení aktivity a úhyn, resp. potlačení růstu mikroorganismů. Potřebné koncentrace kovových iontů se pohybují kolem miliontin procent (ppm).*“²⁶

2) Látky pevně vázané na vlákno

Do této skupiny patří kvartérní amoniové soli chitin a chitosan vázané na pryskyřicích. Při kontaktu mikroorganismu s těmito látkami dochází ke změně metabolismu enzymů, následkem je poškození buněčných stěn a destrukce buňky.

²⁵ *Textilie v novém tisíciletí II a Obrazová analýza v textilu.* Vydání první. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2004. Vysoce funkční vlákna, s. 7-8. ISBN 80-7083-818-3.

²⁶ *Textilie v novém tisíciletí II a Obrazová analýza v textilu.* Vydání první. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2004. Vysoce funkční vlákna, s. 8. ISBN 80-7083-818-3.

2.3.3 Kultivace bakterií

Kultivace, nebo-li pěstování mikroorganismů, je prováděna na kultivačních médiích (půdách). „*Kultivační média půdy – prostředí, která jsou používána ke kultivaci buněk, bakterií a dalších mikroorganismů. Mají definované složení.*“²⁷

Fyziologie bakterií je velmi rozmanitá, a proto existuje také široká škála živných půd. Živná média lze dělit také podle jejich složení či účinku. Z hlediska složení jsou rozlišována media minimální a komplexní, kdy se minimální media skládají na rozdíl od komplexních pouze z nezbytnějších živin a jsou chemicky definována. Minimálním médiem může být zvláštní případ medium minerální, které je tvořeno pouze jednou látkou (např. glukózou). Komplexní media jsou obohacena hydrolyzátem kvasinek, kaseinu či masa (pepton-směs natrávených aminokyselin). Dalším typem živných půd jsou půdy selektivní, které se liší reakcí na jednotlivé bakteriální druhy. Selektivní půdy mají schopnost podporovat růst určitého druhu bakterií a zároveň inhibovat růst jiného druhu. Další skupinou živných půd, které reagují odlišně na jednotlivé druhy bakterií, jsou půdy diagnostické. Diagnostické půdy obsahují indikátory reagující na růst specifických bakterií (např. reakce na změnu pH). Základním dělením těchto kultivačních půd je dělení na kultivační půdy tekuté a pevné.

2.3.3.1 TEKUTÉ ŽIVNÉ PŮDY

Směs živin je rozpuštěna ve vodě. Používají se především k pomnožení bakterií pro účely další diagnostiky. Mezi tekuté půdy patří například bujón (masový vývar)



nebo masopeptonový bujón, se složením:

| | |
|---|------------|
| „masový extrakt (vodný vývar v prášku) | 10g |
| pepton (enzymatický hydrolyzátní maso) | 10g |
| NaCl | 5g |
| destilovaná voda | ad 1000 ml |

Obr. 11 Tekuté živné půdy

(Dostupný z <http://mikrobiologie.unas.cz/soubory/kultivace.pdf>)

pH 7,0²⁸

²⁷ *Lekarske.slovníky.cz* [online]. 2008 - 2010 [cit. 2010-06-01]. Velký lékařský slovník On-Line. Dostupné z WWW: <<http://lekarske.slovníky.cz/pojem/kultivace>>.

²⁸ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 79 ISBN: 80-901521-4-7.

2.3.3.2 PEVNÉ ŽIVNÉ PŮDY

Jsou složeny ze směsi živin obohacujících agarový gel a slouží ke kultivaci bakterií. Základní nosnou strukturou pevných půd je nejčastěji agar, což je polysacharidový polymer z mořských řas. „*Bakterie se pěstují na živných půdách v kulatých skleněných nebo plastových miskách.*

Rostou v malých bobcích, kterým se výstižně říká

kolonie, neboť osídlují jim přidělené území. Bez poznání kolonií by neměla bakteriologie dnešní podobu.“²⁹



Obr. 112 Krevní agar

Pevné živné půdy použil již Robert Koch při svých výzkumech: „*zavedení agarových půd znamenalo revoluci a novou epochu v mikrobiologii. Neboť zatím co až do Kocha byly bakterie studovány a pozorovány pod mikroskopem jako jedinci žijící mezi jedinci jiných druhů, zpevněné živné půdy daly možnost získávat klony bakteriálních populací pocházející z jediné buňky, pracovat s nimi a zkoumat je, pomnožovat a udržovat přeočkováním do nového, vysterilizovaného, třeba již tekutého media. Byla – krátce řečeno – vytvořena možnost pracovat s čistými kulturami bakterií.*“³⁰

Kolonie bakterií mají typickou morfologii závislou především na druhovém původu a na složení živné půdy. Při popisu bakteriálních kolonií je popisována:

1) Velikost – podle velikosti dělíme kolonie:

„ - *Drobné méně než 1 mm*

- *Malé 1 mm*

- *Střední 2-3 mm*

- *Velké 5 mm a více*“³¹

²⁹ SCHINDLER, Jiří. *Ze života bakterií: kolonie bakterií jako organizovaný útvar mnoha buněk*. Vydání první. Praha : Academia, 2008. 38 s. ISBN 978-80-200-1666-9.

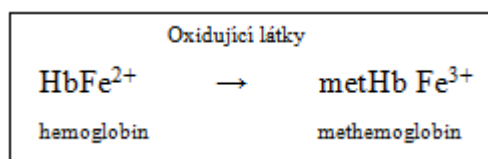
³⁰ BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. Bakteriologie, s. 19 ISBN: 80-901521-4-7.

³¹ 3. *Lékařská fakulta Univerzity Karlovy* [online]. 2007 [cit. 2010-06-01]. Mikrobiologie.unas. Dostupné z WWW: <<http://mikrobiologie.unas.cz/soubory/kultivace.pdf>> .

- 2) Tvar – kruhový, oválný, různě členěný (vláknitý, nepravidelný...)
- 3) Povrch kolonií – „*hladký, lesklý, matný, drsný, vrstevnatý, zrnitý*“³²
- 4) Barva kolonie – barva kolonie je závislá na živné půdě (např. diagnostické půdy – barevná reakce indikátoru na změnu pH) nebo na pigmentech, které některé bakterie produkují ((*Micrococcus luteus* – žluté kolonie na krevním agaru). Obvyklá barva většiny bakteriálních kolonií je šedobílá.
- 5) Konzistence kolonie – kolonie mohou být mazlavé či suché a také mohou být hladké či zarostlé do agaru.
- 6) Zápach kolonie – bakterie příjemně voní, zapáchají či jsou bez zápachu.
- 7) Okolí kolonie – změna barvy kolonií je typická pro diagnostické půdy (reakce indikátoru na změnu pH) a pro krevní agar, na kterém dochází působením některých druhů bakterií k rozkladu hemoglobinu – hemolýze.

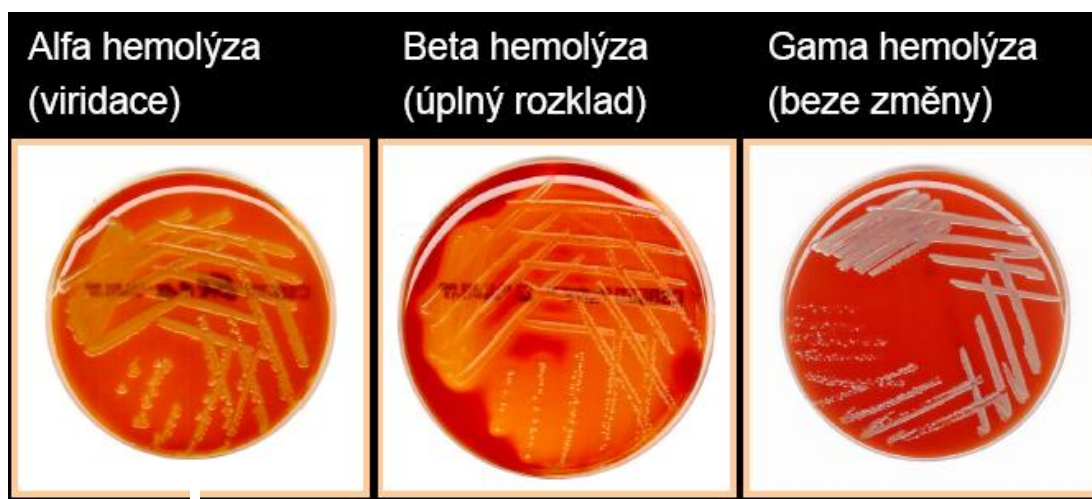
2.3.3.3 TYPY HEMOLÝZY

A) Alfa hemolýza – zelenohnědé zbarvení okolí bakteriálních kolonií způsobené částečným rozkladem hemoglobinu na methemoglobin.



B) Beta hemolýza – úplný rozklad hemoglobinu, půda je projasněná.

C) Gama hemolýza – nedochází k rozkladu hemoglobinu.



Obr. 13 Typy hemolýzy
(Dostupný z <http://mikrobiologie.unas.cz/soubory/kultivace.pdf>)

³² 3. *Lékařská fakulta Univerzity Karlovy* [online]. 2007 [cit. 2010-06-01]. Mikrobiologie.unas. Dostupné z WWW: <<http://mikrobiologie.unas.cz/soubory/kultivace.pdf>>.

Agar může být obohacen různými látkami, existuje tedy velké množství různých typů pevných půd, jejichž základní nosnou látkou je agar. Mezi nejpoužívanější pevné půdy patří krevní agar.

Krevní agar

Nejpoužívanější kultivační medium, které se vyrábí přidáním beraních krvinek do chladnouceho agaru. Krvinky se přidávají při teplotě zhruba 56 °C. Krevní agar může sloužit částečně také jako půda diagnostická – hemolytické bakterie se mohou na krevním agaru projevit.



Obr. 14 Bakteriální kolonie na krevním agaru

Další typy pevných půd

Agar může být obohacen o různé přísady – obohacený bujónem (živný agar), krvinkami za vyšší teploty (čokoládový agar) a mnoha dalšími roztoky a jinými přísadami.



Obr. 15 Čokoládový agar

(Dostupný z: <http://mikrobiologie.unas.cz/soubory/kultivace.pdf>)

2.4 Obrazová analýza

Obrazová analýza je moderní metoda, která vznikla v 60. letech 20. století ve snaze o objektivizaci při analýze objektů. V této době bylo vybavení potřebné k analýze obrazu drahé a nedostupné.

„Metoda analýzy obrazu byla nejprve využívána ve vojenství – topografie krajiny.“³³ V současné době se stala obrazová analýza velmi využívanou metodou v mnoha oblastech (potravinářství – např. analýza poškození obilných zrn, mikrobiologie – např. **počítání mikrobiálních kolonií**, možnosti zpracování obrazu pro textil – např. průměry a plochy řezů vláken a mnoho dalších oblastí).

Výhodou obrazové analýzy je zejména to, že:

- „nahrazuje vizuální subjektivní hodnocení, při kterém může právě dojít k rozdílnému ohodnocení určitého znaku zkoumaného předmětu“³⁴
- „umožňuje přizpůsobivost a opakovatelnost rozboru, nedochází k destrukci vzorku“³⁵

Rozšíření oblasti využití obrazové analýzy vede k rozvoji a zdokonalování hardwarových i softwarových prostředků potřebných pro tuto metodu. Dnes jsou tyto prostředky snadno dostupné.

„Obrazová analýza umožňuje nahrazení subjektivního posuzování obrazů pomocí objektivních charakteristik. Obecně lze obrazovou analýzu rozdělit do tří etap:

1. tvorba obrazu (náhrada klasické fotografie),
2. počítačem podporovaná analýza obrazu,
3. analýza vybraných (charakteristických) rysů obrazu.“³⁶

³³ Technická univerzita v Liberci [online]. 2007 [cit. 2010-06-10]. Fakulta textilní. Dostupné z WWW: <http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20060106/zvt_p_4.pdf>.

³⁴ Vysoká škola Chemicko-Technická v Praze [online]. 2009 [cit. 2010-06-10]. Ústav konzervace potravin a technologie masa. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/obraz.pdf>.

³⁵ Vysoká škola Chemicko-Technická v Praze [online]. 2009 [cit. 2010-06-10]. Ústav konzervace potravin a technologie masa. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/obraz.pdf>.

³⁶ Textilie v novém tisíciletí II a Obrazová analýza v textilu. Vydání první. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2004. Obrazová analýza a Matlab, s. 23. ISBN 80-7083-818-3.

Na kvalitě provedení první etapy získávání digitálního obrazu závisí další kroky obrazové analýzy. Kvalita obrazu determinuje rychlost, přesnost a kvalitu dalších kroků. Také ovlivňuje složitost dalších postupů – pokud je digitální obraz kvalitní, není zapotřebí provádět mnoho dalších úprav pro vylepšení kvality obrazu. Vlastní analýza obrazu je realizována pomocí vhodného počítačového softwaru.

2.4.1 Vytvoření obrazového záznamu

Prvním krokem obrazové analýzy je vytvoření digitálního obrazu. Digitální záznam lze získat přímo, použitím digitálního fotoaparátu, nebo nepřímo, kdy je analogový záznam převeden pomocí scanneru do digitální podoby.

V současné době se do popředí dostaly digitální fotoaparáty a práce s analogovým záznamem je dnes spíše ojedinělá. Při pořizování digitálního záznamu jsou využívány digitální zrcadlovky, které mají oproti kompaktním fotoaparátům značné přednosti. Zásadní rozdíl je v kvalitě pořízeného snímku - obraz pořízený za použití digitální zrcadlovky se vyznačuje kvalitnější kresbou a nižší hladinou šumu v obraze. Z konstrukce digitální zrcadlovky vyplývá pouze jedna nevýhoda:

„konstrukce běžné digitální zrcadlovky je založena na principu použití sklopného zrcátka před snímacím čipem. Proto se zrcadlovky označují jako DSLR (Digital Single Lens Reflex). Toto zrcátko odráží světlo, které projde objektivem, do optického hledáčku.

A když je zmáčknuta spoušť, sklopí se toto zrcátko nahoru, čímž uvolní cestu světlu přímo směrem skrz závěrku na snímač. Proto u klasických zrcadlovek není možné pozorovat fotografovanou scénu na displeji. Logické zároveň je, že v době expozice v hledáčku nic neuvidíme (zrcátko je sklopené, veškeré světlo jde na čip a ne do hledáčku)“.³⁷ Jedinou nevýhodou práce s digitální zrcadlovkou je tedy nemožnost pozorovat fotografovanou scénu na displeji. V tabulce uvedené na další straně jsou vypsány další rozdíly kompaktních fotoaparátů a digitálních zrcadlovek.

³⁷ Fotoradce.cz [online]. 2005-2010 [cit. 2010-06-16]. Digitální zrcadlovku nebo kompakt?. Dostupné z WWW: <<http://www.fotoradce.cz/digitalni-zrcadlovku-nebo-kompakt-clanekid77>>.

| Parametr porovnání | Kompakty | Digitální zrcadlovky |
|--|-----------------------------|-------------------------------------|
| Jednoduchost ovládání | Velká | Malá až střední |
| Hmotnost | Velmi malá až střední | Střední až velmi vysoká |
| Rozměry | Miniaturní až střední | Střední až extrémně vysoké |
| Funkční vybavení | Malé až střední | Vysoké až velmi vysoké |
| Kvalita fotografií (celkově) | Podprůměrná až velmi dobrá | Velmi dobrá až vynikající |
| Rychlost fotoaparátu | Malá až velmi dobrá | Velmi vysoká až extrémně vysoká |
| Jednoduchost manipulace s fotoaparátem při fotografování | Velmi vysoká | Velmi nízká až mírně vysoká |
| Cena fotoaparátu | Velmi nízká až mírně vysoká | Mírně vysoká až neuvěřitelně vysoká |
| Ceny příslušenství | Střední až vysoké | Vysoké až extrémně vysoké |
| Komfort při fotografování | | |

Tabulka 1 Rozdíly kompaktních fotoaparátů a digitální zrcadlovky
(dostupný z <http://www.fotoradce.cz/digitalni-zrcadlovku-nebo-kompakt-clanekid77>)

K vytvoření digitálního obrazu mohou sloužit také digitální kamery, které umožňují zachycení dlouhodobých biologických procesů. „Tyto drobné videokamery mají v některých případech integrovány kolem objektivu do kruhu uspořádané LED diody, které „bezstínově“ nasvítí cílový objekt. Pro zpracování videozáznamu cestou analýzy obrazu existují úzce specializované programy, které jsou schopny analyzovat v reálném čase vysoký datový tok spojení s frekvencí snímkování. Příkladem velmi rozšířeného softwaru pro oblast zemědělství a biologie je program *EthoVision*.“³⁸

Poslední možností vytvoření digitálního obrazu je použití plošného scanneru, který snímá plošné objekty – například ho lze použít k získání obrazu listových skvrnitostí přímo z živého vzorku.

³⁸ *Vurv.cz* [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.

K vytvoření digitálního obrazu jsou nejčastěji používány digitální fotoaparáty. Při fotografování působí několik faktorů, které ovlivňují kvalitu výsledné digitální fotografie. Mezi tyto faktory patří:

2.4.1.1 Nastavení fotoaparátu

„Obecné doporučení je použít nejvyšší možné rozlišení a nejmenší míru komprese. Vždy platí, že je lepší následně snižovat obrazové rozlišení a úroveň komprese než převzorkovávat na vyšší rozlišení.“³⁹

Komprese fotografií – *„Na JPEG a další kompresní formáty fotografií se aplikuje takzvaná komprese. Jedná se o proces, který má za cíl zachovat dobrou kvalitu pořízené fotografie a zároveň snížit její datový objem na únosnou míru. Většina lepších fotoaparátů umožňuje nastavit tuto míru komprese. Pokud Vám na snímcích velmi záleží, použijte menší míru komprese.“⁴⁰*

Rozlišení fotoaparátu – vyjadřuje, jak hustou síť bodů je snímací čip schopný zaznamenat (je udáváno v obrazových bodech – pixel). *„Pokud tedy máme fotoaparát o rozlišení 4Mpix, výsledná fotografie bude složená ze 4 milionů barevných bodů, 5Mpix fotografie bude složená z 5 milionů bodů, apod.“⁴¹*

2.4.1.2 Nasvícení snímaného objektu

Nasvícení snímaného objektu je velmi důležitým krokem celé obrazové analýzy. Stíny vzniklé při nedokonalém nasvícení objektu komplikují další kroky obrazové analýzy a mohou i výsledky obrazové analýzy zkreslit. Při fotografování je vhodné použít stativ a hlavu stativu naklonit tak, aby byl objektiv fotoaparátu a snímáný

³⁹ Vurv.cz [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.

⁴⁰ Fotoradce.cz [online]. 2005-2010 [cit. 2010-06-16]. Fotorádce-slovník digitální fotografie. Dostupné z WWW: <<http://www.fotoradce.cz/slovník.php>>.

⁴¹ Fotoradce.cz [online]. 2005-2010 [cit. 2010-06-16]. Fotorádce-slovník digitální fotografie. Dostupné z WWW: <<http://www.fotoradce.cz/slovník.php>>.

objekt kolmo. Velmi důležité je rovnoměrné nasvícení objektu. Rovnoměrné nasvícení je také velmi důležité při fotografování dokumentů, proto lze postup popsaný pro nasvícení dokumentů použít také pro nasvícení objektů, které budeme analyzovat v praktické části (bakteriální kolonie).

Postup nasvícení:

„Pokud budete chtít (nebo muset) použít světlo umělé, tak budete muset buď použít jedno velmi výkonné světlo a nebo více méně výkonných zdrojů.

Při použití jednoho zdroje světla (například stropní osvětlení místnosti) je velmi důležité, aby bylo umístěno nad fotografovaným dokumentem. To nám zajistí rovnoměrnost jeho nasvícení.

Při použití dvou menších zdrojů světla je nutné nasvítit dokument z dvou protilehlých stran. Dobře mohou posloužit dvě stolní lampy, které si napolohujete tak, aby svou polohou na stole byly co nejvíce zrcadlově proti sobě.“⁴²

Snímaný objekt je také možné nasvítit zespoda, což může být vhodné v mikrobiologii k analýze počtu či velikostí.

Při spojení fotoaparátu s mikroskopem lze využít osvětlení umístěného přímo na objektivu mikroskopu: „problém eliminace stínů a opakovatelnosti svícení asi nejlépe řeší využití kruhového osvětlení nasazeného přímo na objektivu mikroskopu. Kruhový zdroj světla poskytuje měkké rozptýlené světlo, které snímaný objekt rovnoměrně nasvítí. Pozor však u lesklých objektů – dochází k nežádoucímu odlesku“⁴³.

2.4.1.3 Pozadí snímaného objektu

Při volbě pozadí je důležitý maximální kontrast pozadí a snímaného objektu. Vhodné je použití jednobarevného podkladu, nejlépe černého nebo bílého. Černé či bílé pozadí také pomáhá při kalibraci bílé/černé barvy, která je prováděna vždy na počátku obrazové analýzy.

⁴² Fotoradce.cz [online]. 2005-2010 [cit. 2010-06-16]. Jak fotografovat dokumenty a listiny. Dostupné z WWW: < <http://www.fotoradce.cz/jak-fotografovat-dokumenty-a-listiny-clanekid114> >.

⁴³ Vurv.cz [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.

2.4.2 Počítačem podporovaná analýza obrazu a analýza vybraných (charakteristických) rysů obrazu

Tyto dvě etapy jsou realizovány již za pomoci počítače a vhodného software. *„Zpracování obrazové informace na počítači má jako hlavní cíl odstranění šumů a extrakci typických rysů, charakterizujících obraz. Základní funkce pro zpracování obrazu vyjádřených ve škále šedi (gray scale) jsou:*

- *potlačení šumu vhodnou prostorovou filtrací (obvykle průměrováním s váhami určujícím příspěvky sousedů),*
- *zaostření obrazu s využitím konvoluce,*
- *detekce hran, vrcholů, údolí pomocí směrových detektorů a transformace,*
- *obecná robustní filtrace (prostorový robustní medián),*
- *segmentace a rozlišení objektů s využitím histogramů stupně šedi (prahování).*

Výsledkem těchto operací je binární obraz jako pole dat obsahující pouze nulu (bílá) nebo jedničku (černá) Element tohoto pole se nazývá pixel (picture element). Zpracování binárních obrazů je úzce spjato s matematickou morfologií. Objekty jsou tvořeny spojením pixelů jednoho typu (černé) a pozadí tvoří množina doplňků (bílé).“⁴⁴

V praktické části je použit volně dostupný software ImageJ.

⁴⁴ *Textilie v novém tisíciletí II a Obrazová analýza v textilu.* Vydání první. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2004. Obrazová analýza a Matlab, s. 23. ISBN 80-7083-818-3.

2.5 ImageJ

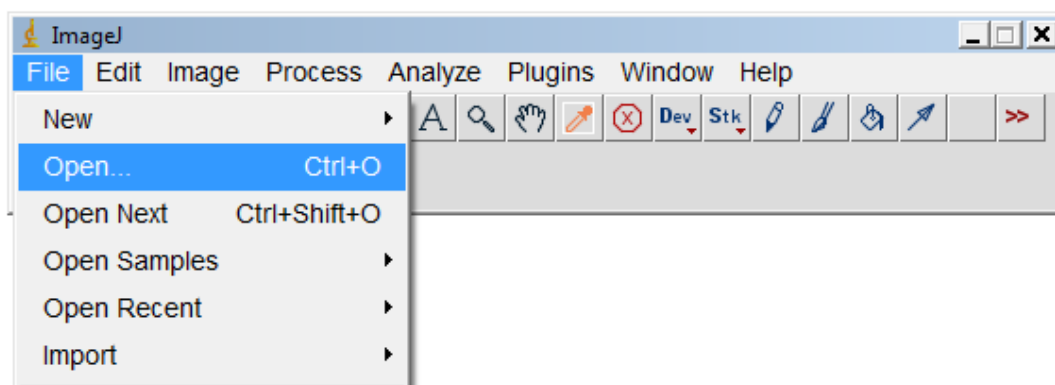
ImageJ je program vyvinutý v Národním ústavu pro zdraví – jak je uvedeno na domovské stránce tohoto programu - „*the author, Wayne Rasband (wayne@codon.nih.gov), is at the Research Services Branch, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA*“.⁴⁵ Tato volně dostupná aplikace umožňuje upravovat a analyzovat 8-bitové, 16-bitové a 32-bitové obrázky ve formátu TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM a RAW. Program ImageJ nabízí veškeré standardní nástroje pro úpravu bitmapové grafiky a také všechny podstatné funkce, které jsou od programu pro obrazovou analýzu vyžadovány.

2.5.1 Představení hlavní nabídky programu ImageJ

2.5.1.1 Otevření digitálního obrazu

Digitální obraz jako předloha pro obrazovou analýzu je otevřen pomocí nabídky **File/Open**. Je možné otevřít také soubory bez dlouhého hledání- použitím nabídky **File/Open Recent** lze otevřít soubory přímo z paměti programu ImageJ, tedy soubory naposledy používané programem ImageJ.

V této nabídce také po dokončení analýzy ukládáme výsledky – **File/Save**.



Obr. 16 Práce v programu ImageJ - otevření souboru

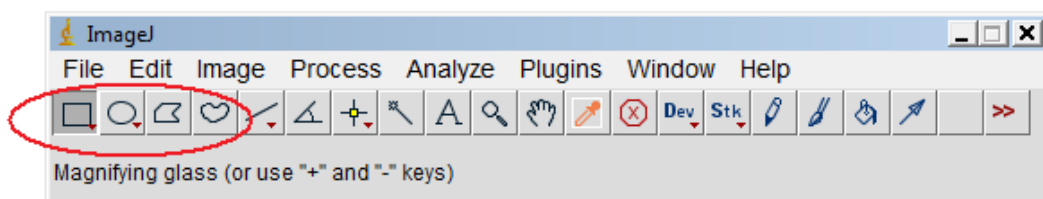
⁴⁵ RSB Home Page [online]. 2008 [cit. 2010-05-27]. ImageJ. Dostupné z WWW: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html>>.

2.5.1.2 Úprava barevného obrazu

Provádět úpravy je možné v programu ImageJ v nabídce **Edit**, **Image** a **Process**.

Edit – „v nabídce Edit je možné provádět běžné typy úprav jako je například kopírování, vkládání, vyřeznutí, rotace, kreslení, invertování, pracovat s výběry, vytvářet masky atd.“⁴⁶ Zejména využívanou úpravou je oříznutí obrazu. „Obsahuje-li nasnímaný obraz pozadí, které by mohlo při další práci s obrazem rušit, lze jej odstranit pomocí této funkce. Nebo v případě, že chceme pracovat jen s určitými objekty lze separovat od zbytku obrazu.“⁴⁷

K označení plochy pro analýzu jsou využívány ikony, vyznačené na obr. 17.



Obr. 17 Práce v programu ImageJ - ikony pro označení části obrazu

Zbytek obrazu je odstraněn nabídkou **Edit/Clear.Outside.**

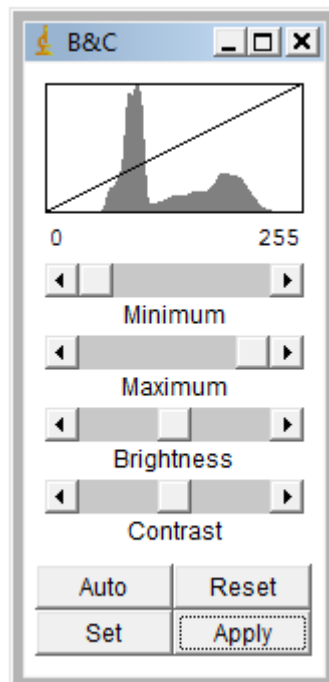
Image – je nabídka složitějších úprav. V nabídce

Image lze upravovat kontrast či světlost obrazu. Další změny barev a intenzity v obraze (jako např. změnu sytosti) jsou prováděny nabídkou **Image/Color**.

Image/Adjust/Brightness/Contrast

„Pokud se sledované detaily v obraze svou světlostí málo liší od ostatních objektů, pak je možné jejich kontrast zvýšit funkcí **Contrast** nebo **Brightness**. Při posouvání hodnot kontrastu na stupnici se v náhledu zobrazuje výsledek nové úpravy,

kteřou potvrdíme příkazem **Apply**.“⁴⁸



Obr. 18 Práce v programu ImageJ - nastavení kontrastu

⁴⁶ Vurv.cz [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.

⁴⁷ Vysoká škola Chemicko-Technická v Praze [online]. 2009 [cit. 2010-06-10]. Ústav konzervace potravin a technologie masa. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/obraz.pdf>.

Process – v této nabídce se nacházejí nabídky dalších úprav, které jsou

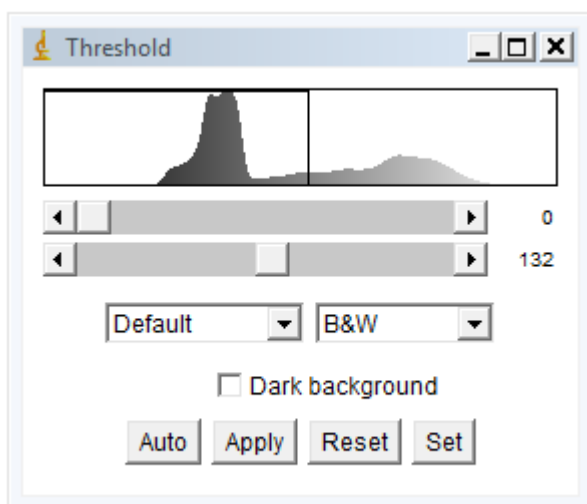
prováděny zejména po provedení prahování (úpravy jbinárního obrazu). Také samotné prahování lze v této nabídce provést – automatické prahování je dostupné v nabídce **Process/ Binary/ Make binary**. Ovšem prahování lze také provádět manuálně (mimo nabídku Process). „Výhoda manuálního prahování spočívá v možnosti kontroly nad celým procesem prahování a tedy maximálně přesným výběrem oblastí, které budou následně podrobeny měření.“⁴⁹

PRAHOVÁNÍ

Je proces, kdy je převáděn barevný obraz na binární – binární obraz obsahuje pouze černou barvu (objekty, které jsou zahrnovány do obrazové analýzy) a barvu bílou (pozadí). Prahovat lze v programu ImageJ pouze

černobílé 8-bitové obrazy, proto je nutné při manuálním prahování nejprve převést obrazovou předlohu do tohoto formátu – **Image/Type/8-bit**.

Nabídka Process obsahuje mnoho možností úpravy obrazu. S takto upraveným obrazem lze provádět manuální prahování, pomocí **Image/Adjust/Threshold**.



Obr. 19 Práce v programu ImageJ - prahování

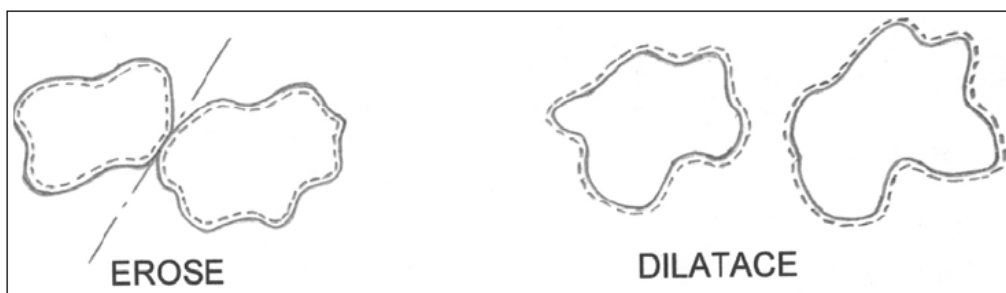
Nabídka Process umožňuje mnoho úprav binárního obrazu – **Process/Binary**:

- **„Eroze/Dilatace, Otevření/Uzavření** – Tyto funkce jsou k sobě navzájem inverzní a jsou určeny výhradně pro binární obraz. Upravují objekty v obraze tak, že je zmenší nebo odstraní (**Erosion**), zvětší a příp. spojí (**Dilate**), vyhladí

⁴⁸ Vurv.cz [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.

⁴⁹ Vurv.cz [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.

obrysy, odstraní malé objekty, rozpojí objekty spojené tenkou šíjí (**Open**) a spojí blízké objekty (**Close**).“⁵⁰



Obr. 20 Práce v programu ImageJ - erose, dilatace

(Dostupné z: http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20060106/zvt_p_4.pdf)

- **Zaplnění děr** – např. při měření plochy objektu *Process/ Binary/Fill holes*
- **Zvýraznění obrysů** – nabídka *Process/ Binary/Outline*
- **Separace objektů** – oddělení překrývajících se nebo dotýkajících se objektů pomocí nabídky *Process/ Binary/Watershed*

2.5.1.3 Měření – nabídka *Analyze*

V nabídce *Analyze* se nachází široký výběr. Na začátku každého měření je důležité nastavit parametry samotného měření. „*Pracujeme-li s již definovanými objekty, které byly definovány prahováním, je nezbytné nastavit, jaká měření mají být na objektech provedena (Analyze/Set measure). Naměřené údaje se vyvolají opět funkcí Analyze/ Analyze particles (použití Analyze/Measure (CTRL+M) zobrazí 1 sumární údaj pro každý měřený parametr vztahující se ke všem objektům jako celku). Základní statistiku naměřených hodnot (střední hodnota, směrodatná odchylka, maximum, minimum) vyvoláme příkazem Analyze/Summarize.*“⁵¹

V praktické části je využito nabídky – počítání objektů a měření vzdálenosti.

⁵⁰ Vurv.cz [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.

⁵¹ Vurv.cz [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.

2.5.1.4 Počítání objektů (bakteriálních kolonií)

Příkaz k počítání objektů je zadán volbou Analyze/Analyze particles.

V nově otevřeném okně je nutné nastavit požadované parametry objektů, které mají být do měření zahrnuty:

Size – velikost objektů, které program zahrnuje do svých výpočtů

Circularity (kruhovitost) – tvar objektů, které má program do svých výpočtů zahrnout

Show – výběr objektů

V tomto okně lze také nastavit různé možnosti zobrazení naměřených hodnot a zjištěných výsledků – a to volbou z nabídky:

Display Results – zobrazení výsledků na displeji (zobrazení tabulky obsahující naměřené hodnoty přímo na displeji)

Clear Results – „vyčistit“ výsledky (*clear = jasný, zřetelný, vyčistit*)

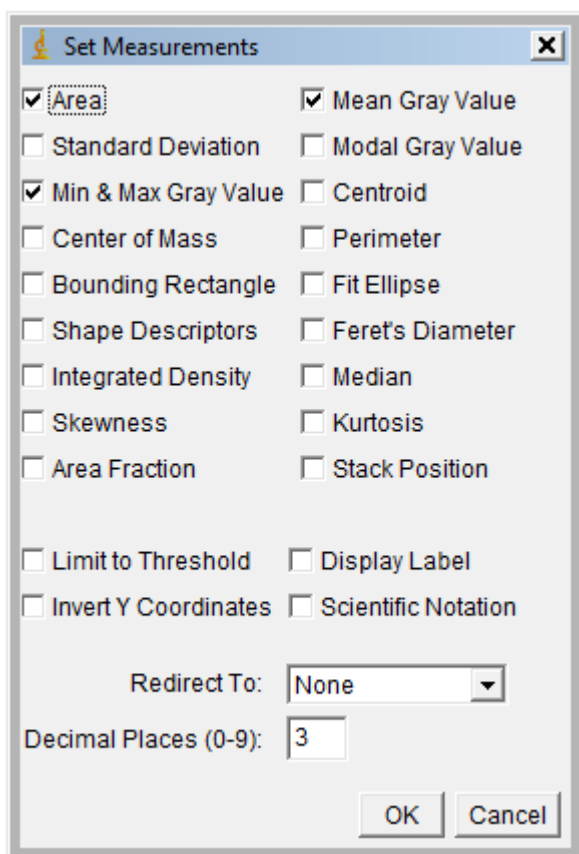
Summarize – souhrn (zobrazení souhrnné samostatné tabulky)

Add to Manager – touto volbou je otevřen samostatný přehled objektů

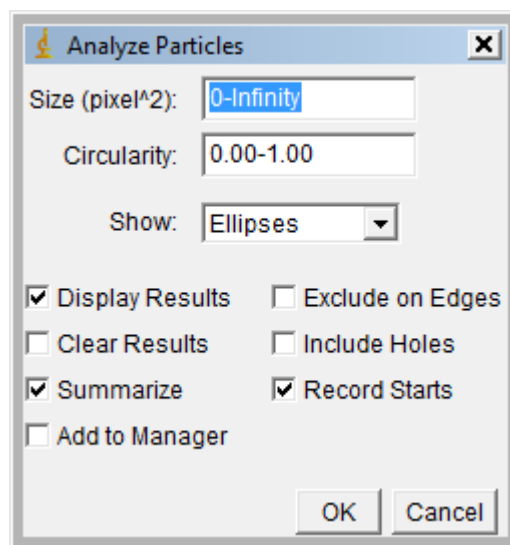
Exclude on Edges – vyloučení okrajů objektu z analýzy

Include Holes – zahrnou do měření také díry

Record Starts – „zaznamenat začátky“




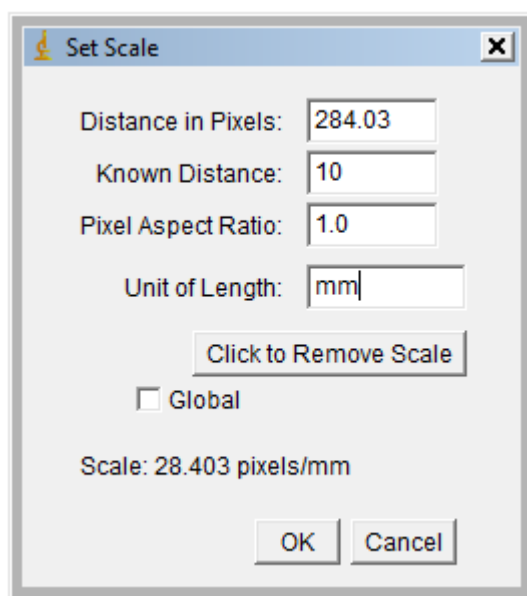
Obr. 22 Práce v programu ImageJ - parametrů měřených objektů



Obr. 21 Práce v programu ImageJ - nastavení měření

2.5.1.5 Měření délek (měření halozóny)

V případě měření délek je nutné jako první provést kalibraci měřítka – to znamená nastavit, kolik pixelů odpovídá určité jednotce délky – např. 1mm. Kalibrace měřítka je provedena v nabídce **Analyze /Set scale**, kde se lze nastavit odpovídající parametry. Před samotným nastavením v této nabídce je vhodné označit na digitálním obrazu vzdálenost dvou bodů, jejíž přesnou délku známe, výběrem ikony  a označením pomocí myši. Výsledky samotného měření délky jsou vyvolány nabídkou **Analyze/Measure** (nebo zkratkou CTRL+M).



Obr. 23 Práce v programu ImageJ - kalibrace měřítka

2.5.1.6 Vytvoření makra

Makro lze vytvořit v nabídce **Plugins/Macros**.

„Makro je uživatelem vytvořená nová funkce tvořená sledem funkcí a jejich nastavením (logaritmem), který byl uživatelem během procesu analýzy obrazu sestaven. Slouží k tomu, aby při opakovaných analýzách nemusely být všechny použité funkce nastavovány a aplikovány manuálně. Celý optimalizovaný algoritmus tak může být spuštěn jedním kliknutím.“⁵²

⁵² Vurv.cz [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.

3 Praktická část

Cílem práce je hodnocení antibakteriálních vlastností materiálů s využitím obrazové analýzy. Ke zpracování výsledku je použit volně dostupný program ImageJ, který nabízí veškeré podstatné funkce, které jsou pro provedení obrazové analýzy potřebné. Při posuzování antibakteriálních vlastností jsem pracovala s bakteriemi *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Jelikož se tyto dva bakteriální druhy liší morfologií (grampozitivní, gramnegativní) i vlastnostmi (např. štěpení hemoglobinu), jsou ideálními modelovými organismy. Inokulum těchto bakterií jsem postupně nanášela na vzorky materiálů s různými typy antibakteriálních úprav – je velmi důležité, aby při práci nedošlo ke kontaminaci vzorků smícháním bakterií. Nebylo by tak možné srovnat vliv na *E.coli* s vlivem *Staphylococcus aureus* na vzorek. Hodnocení vzorků a účinnosti použitých úprav vycházelo z amerických norem AATCC Method 100, AATCC Method 147.

„AATCC Test Method 147:2004 Antibacterial Activity Assessment of Textile materials: Parallel Streak Method

- *naočkuje se na agar (Stahů kličkou) a na něj se položí vzorek*
- *hodnotí se inhibiční zóna*

AATCC Test Method 100:2004 Antibacterial Finishes on Textile Materials

- *nanesení suspenze na testovaný vzorek – působení úpravy*
- *kultivace (výluh) vzorku v neutralizačním médiu*
- *očkování na agar a stanovení počtu kolonií“⁵³*

Výsledky získané těmito metodami jsem nafotila. K focení jsem použila vlastní kompaktní fotoaparát. Získaný digitální obraz jsem podrobila obrazové analýze v programu ImageJ. Pomocí programu jsem měřila vzdálenosti v obraze (práce s výsledky AATCC Method 147) a počítala objekty na určité ploše (práce s výsledky AATCC Method 100).

Praktická část je rozdělena do tří částí – hodnocení účinnosti antibakteriálních úprav výsledků získaných metodou AATCC Method 100, AATCC Method 147 a hodnocení výsledků, které jsem získala úpravou postupu AATCC Method 147 (otisk plochy pod vzorkem materiálu a stěr odebraný z plochy pod vzorkem).

⁵³ *Textilie v novém tisíciletí VI*. Vydání první. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2008. Stanovení antibakteriální účinnosti textilu, s. 93. ISBN 978-80-7372-324-8.

3.1 Příprava inokula

Inokulum (určitý počet zárodků v suspenzi) je připravováno pomocí přístroje Denzi-La-Metr, který umožňuje měření zákalu roztoků. Pracuje na bázi měření optické absorbance. Inokulum se připravuje odebráním již naočkovaných bakterií, které jsou rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. Přesná koncentraci inokula je zjištěna pomocí Denzi-La-Metru. Po zjištění přesné koncentrace je často potřeba inokulum dále ředit. Na přípravu inokula pro hodnocení AATCC Method 147 je potřeba koncentrace 10^8 bakterií/ml, ta odpovídá 1,0 v jednotkách Denzi-La-Metru. Ovšem pro přípravu inokula pro hodnocení AATCC Method 100 se používá koncentrace 10^5 bakterií/ml a tu již získáváme naředěním koncentrace 10^8 bakterií/ml.

3.1.1 Princip ředění

Obecně je-li odebráno 0,1 ml suspenze určité koncentrace bakterií a následně přidáno do 10 ml fyziologického roztoku, koncentrace se změní o dva řády. V případě odebrání 1 ml suspenze určité koncentrace bakterií a poté přidání do 9 ml fyz. roztoku se koncentrace mění o 1 řád (popřípadě lze použít poměr 0,5 suspenze na 5,5 fyz. roztoku).

Například odebráním 0,1 ml suspenze o koncentraci 10^8 bakterií/ml do 10 ml fyziologického roztoku získáme novou koncentraci 10^6 bakterií/ml. Dalším ředěním 0,1 ml této suspenze o koncentraci 10^6 bakterií/ml tentokrát do 9 ml fyziologického roztoku získáme koncentraci 10^5 – to je koncentrace inokula potřebná pro hodnocení AATCC Method 100.

3.1.2 Postup:

1. Odebrání naočkovaných bakterií očkovací kličkou (dvě větší kolonie)
2. Rozpuštění odebraných bakterií ve fyziologickém roztoku (ve speciální zkumavce pro Denzi-La-Metr)

Fyziologický roztok = 8,5g NaCl / 1000ml destilované vody

3. Zjištění přesné koncentrace inokula pomocí Denzi-La-Metru – roztok je ředěn tak, aby se dosáhlo koncentrace 10^8 bakterií/ml, což odpovídá v jednotkách Denzi-La-Metru 1,0
4. Možné naředění inokula na jinou koncentraci podle principu ředění

3.2 Hodnocení antibakteriálních úprav - výsledky získané metodou AATCC Method 100 – An American Standard 1993

Touto metodou jsem hodnotila antibakteriální úpravy materiálů Amanda, Sandra a vlny s přídavkem Ag^+ . Na tyto materiály jsem nanášela bakterie *Escherichia coli* (dále v textu pouze E.C.) a *Staphylococcus aureus* (dále v textu pouze S.A.). Zjištění účinnosti antibakteriálních úprav vychází ze srovnání výsledků materiálu upraveného a téhož materiálu bez antibakteriální úpravy – pracovala jsem tedy se 12 vzorky. Hodnocení účinnosti antibakteriální úpravy touto metodou je založeno na srovnání počtu vzniklých bakteriálních kolonií u vzorku neupraveného a u téhož materiálu s antibakteriální úpravou. Program ImageJ byl tedy při hodnocení výsledků získaných metodou AATCC Method 100 použit k určení počtu bakteriálních kolonií na určité ploše.

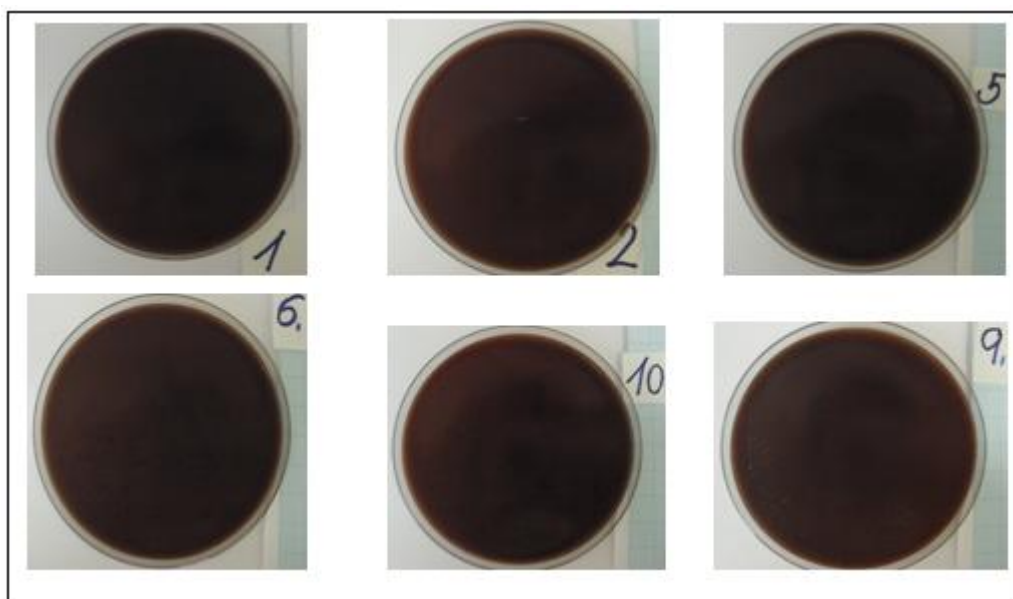
3.2.1 Postup:

1. Příprava vzorku materiálu o rozměrech 18 x 18 mm
2. Umístění vzorku do jednorázového sterilního kontejneru
3. Nanesení 0,1 ml očkovacího inokula (10^5 bakterií/ml) na testované vzorky
4. Inkubace testovaného vzorku 24 hodin při teplotě 37 °C
5. Přenesení testovaného vzorku sterilní pinzetou do sterilního kontejneru, který obsahuje 10 ml fyziologického roztoku
6. Vymývání vzorku pomocí přístroje Wortex
(získání koncentrace 10^3 bakterií/ml)
7. Nanesení 1 ml z výluhu na živnou půdu (krevní agar) – rozprostření výluhu po celé ploše Petriho misky
8. Zaschnutí vzorku – několik minut v termostatu s odklopeným víčkem
9. Inkubace vzorku 24 hodin při teplotě 37 °C s víkem otočným směrem dolů
10. Pořízení digitálního záznamu a vyhodnocení výsledků za použití obrazové analýzy s pomocí programu ImageJ

3.2.2 Zjištění počtu bakteriálních kolonií:

3.2.2.1 Materiály bez antibakteriální úpravy

Tyto neupravené materiály neměly inhibiční vliv na růst bakterií. Celý povrch Petriho misky byl porostlý souvislou vrstvou bakterií. V tomto případě je stanoveno, že počet bakteriálních kolonií se rovná 1000.



Obr. 24 AATCC Method 100 – souvislá vrstva bakteriálních kolonií na materiálech bez antibakteriální úpravy

3.2.2.2 Materiály s antibakteriální úpravou

K určení počtu bakteriálních kolonií materiálů s antibakteriální úpravou jsem použila program ImageJ. Při první části praktické práce s materiály (zjišťování účinku antibakteriálních vlastností za použití metody AATCC Method 100 u vzorků Amanda, Sandra a vlna s přídavkem Ag^+) působilo několik faktorů, které negativně ovlivnily fotografování a výsledky. Hlavními faktory byly:

3.2.2.3 Výrobní čísla na Petriho miskách s krevním agar

Výrobní číslo, které je umístěno na spodní straně misky, při fotografování prosvítá – důvodem je černá barva výrobního čísla, která je výraznější než červená barva krevního agaru. Oblasti, kde černě zbarvené výrobní číslo misky prosvítá, ovlivňují celkový vzhled výsledné fotografie. Jelikož při obrazové analýze pracuje

program s obrazy, které jsou černobílé, a bere v potaz také stíny a různé barevné nádechy, vyhodnotí tento prosvítající tmavší útvar jako další objekt a zahrnuje ho do výpočtů.

Pro zkvalitnění metody a získání nezkreslených výsledků je potřeba toto výrobní číslo odstranit – v další práci jsem před fotografováním misek výrobní číslo misky smyla propan-2-olem.



Obr. 26 Miska před odstraněním výrobního čísla



Obr. 25 Miska po odstranění výrobního čísla

3.2.2.4 Osvětlení

Při práci jsem použila osvětlení objektu zespodu a fotografování bez umělého světla. Tyto typy osvětlení se ukázaly jako nevhodné. Osvětlení objektu zespoda nebylo vhodné, přestože v některých použitých zdrojích bylo uváděno jako osvětlení vhodné pro počítání objektů pomocí obrazové analýzy. Při osvětlení zespodu rušivě působí zóny beta-hemolýzy, které jsou na ploše nerovnoměrně rozmístěny. Tyto oblasti propouštějí při osvětlování zespodu více světla a vytvářejí tak nerovnoměrné osvětlení vzorku – je tedy vhodnější vzorek osvítit ze shora alespoň dvěma lampami umístěnými naproti sobě.



Obr. 28 Nerovnoměrné osvětlení způsobené hemolýzou – barevná předloha



Obr. 27 Nerovnoměrné osvětlení způsobené hemolýzou – binární obraz

3.2.2.5 Postup při práci s programem ImageJ:

1) V programu ImageJ jsem otevřela fotografii – nabídka File/Open.



2) Výběrem nabídky a táhnutím myši označím pouze plochu, s kterou chci dále pracovat - ohraničím misku s krevním agarem.

3) Zbytek fotografie (pozadí) odstraním pomocí nabídky Edit/Clear Outside.

4) Fotografie převedu do formátu 8-bit - nabídka Image/Type.

5) V nabídce Image/Adjust upravím fotografii – před samotnou analýzou je nutné nastavit práh volbou podnabídky threshold a v nově otevřeném okně nastavit práh pomocí posuvného panelu, který je potvrzen volbou Apply.

6) Nyní je fotografie připravena a mohu zadat samotný příkaz pro počítání bakteriálních kolonií – nabídka Analyze/Analyze particles.

7) V nově otevřeném okně nastavím požadované parametry a pomocí tlačítka OK potvrdím příkaz.

Size – velikost objektů, které má program do svých výpočtů zahrnout

Circularity(kruhovitost) – tvar objektů, které má program do svých

výpočtů zahrnout

Show – výběr objektů

8) Program ImageJ vygeneruje tabulku nalezených objektů. Můžeme si vybrat, jestli chceme tabulku, která obsahuje bližší informace o nalezených objektech (např. jejich velikost) nebo tabulku celkovou, kde máme souhrn nalezených objektů. Při zhodnocování výsledků jsem používala tabulku sumární, protože v případě zjištění účinnosti antibakteriální úpravy za použití AATCC Method 100 je rozhodující počet kolonií a jejich velikost se ve výpočtu nezohledňuje.

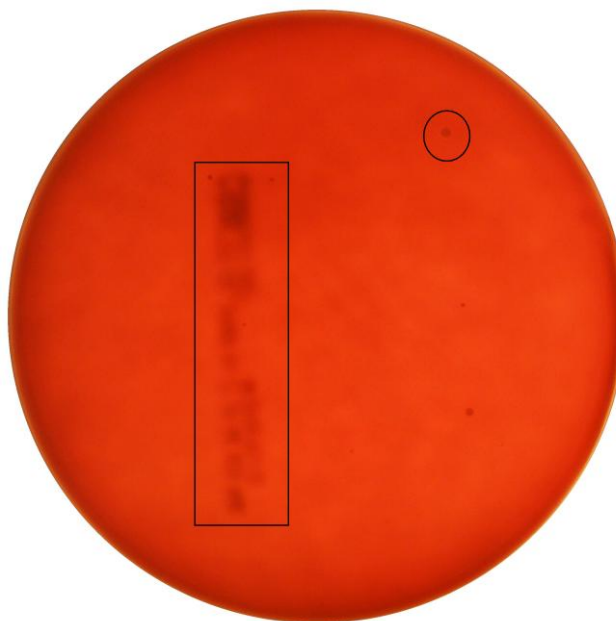
3.2.3 Výsledky práce s programem ImageJ:

Počet bakteriálních kolonií vzorků s antibakteriální úpravou bylo možno zjistit pomocí programu ImageJ pouze u těchto vzorků:

č.4 Amanda (S.A.), č.8 Sandra(S.A.) vzorku č. 11 vlna s přidavkem Ag^+ (E.C.)

U ostatních upravených vzorků bylo nemožné dosáhnout výsledků dobré kvality z důvodu působení rušivých vlivů.

U vzorků č.3 Amanda(E.C.) a vzorku č. 12 vlna s přidavkem Ag^+ (S.A.) nebylo možné spočítat bakteriální kolonie z důvodu rušivého vlivu výrobního čísla na misce. Výrobní číslo bylo výraznější než bakteriální kolonie.



Obr. 29 Negativní vliv prosvítajícího výrobního čísla misky

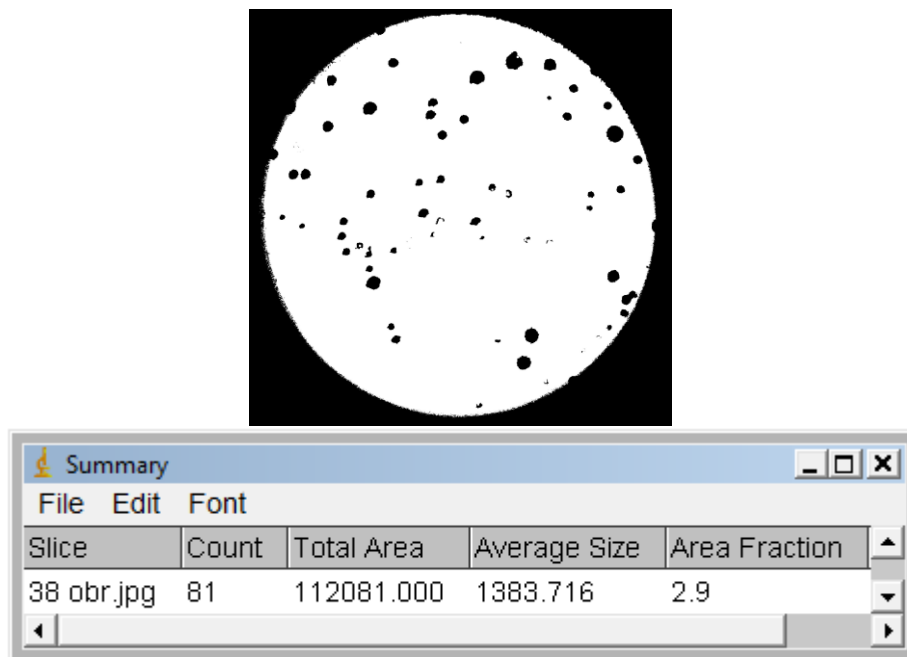
U vzorku č.7 Sandra (E.C.) byly výsledky velmi zkreslené nevhodným osvětlením zespoda – viz obr 18.

Počty bakteriálních kolonií u vzorků č.4 Amanda (S.A.), č. 8 Sandra (S.A.)

a č. 11 vlna s přidavkem Ag^+ (E.C) byly určeny pomocí programu ImageJ. I tyto výsledky se však liší od výsledků, které jsem získala klasickým počítáním.

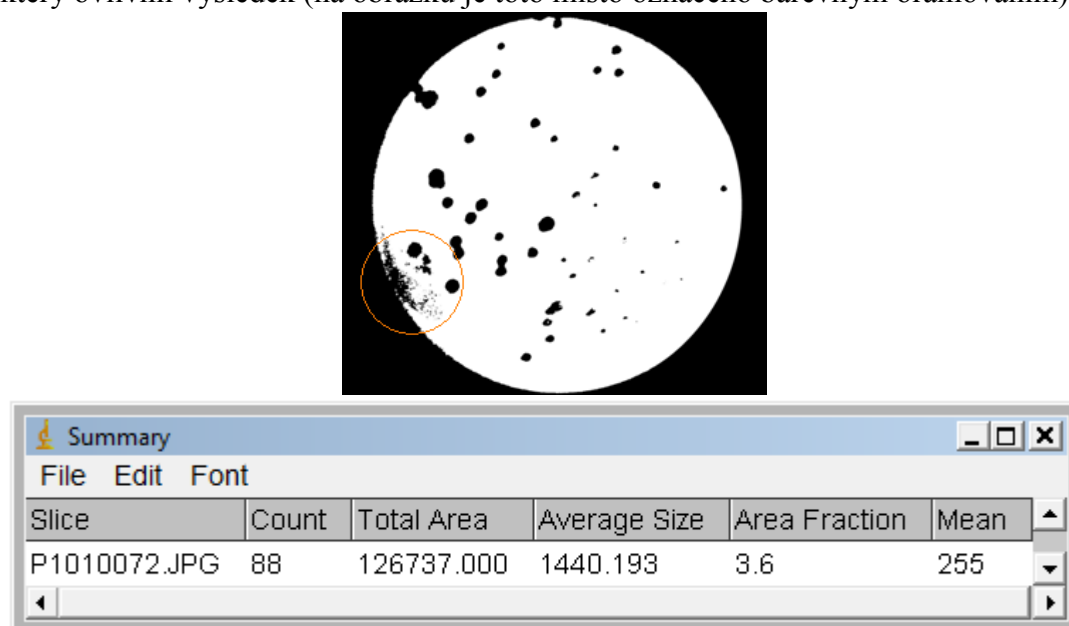
Jelikož jsem si při počítání z digitálního obrazu pouhým okem bakteriální kolonie odškrtovala na monitoru, předpokládám, že toto počítání je přesnější.

U vzorku číslo č.4 Amanda (S.A) jsem manuálním počítáním došla k závěru, že vzorek obsahuje 83 bakteriálních kolonií. Za použití programu ImageJ 81 kolonií.



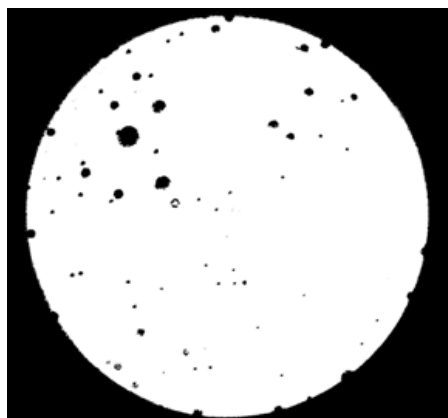
Obr. 30 AATCC Method 100 - výsledky vzorku Amanda s antibakteriální úpravou (kolonie S.A.)

U vzorku č. 8 Sandra (S.A.) jsem manuálním počítáním zjistila, že vzorek obsahuje 67 bakteriálních kolonií. Za použití ImageJ 88 kolonií. Nepřesnost byla způsobena pravděpodobně nevhodným nasvícením objektu - na fotografii vznikl stín, který ovlivnil výsledek (na obrázku je toto místo označeno barevným orámováním).



Obr. 31 AATCC Method 100 - výsledky vzorku Sandra s antibakteriální úpravou (kolonie S.A.)

U vzorku číslo č.11 vlna s přidavkem Ag^+ (E.C.) jsem manuálním počítáním zjistila, že vzorek obsahuje 108 bakteriálních kolonií. Za použití programu ImageJ jsem zjistila počet 113 kolonií.



| Summary | | | | |
|----------------|-------|------------|--------------|---------------|
| File Edit Font | | | | |
| Slice | Count | Total Area | Average Size | Area Fraction |
| P1010087.JPG | 113 | 64359.000 | 569.549 | 1.6 |

Obr. 32 AATCC Method 100 - Výsledky vzorku vlny s antibakteriální úpravou (kolonie E.C.)

Ze zjištěného počtu kolonií jsem vypočítala účinnost bakteriálních úprav. Celkové procento redukce bakterií je počítáno podle vzorce:

$$R = 100 \times (B - A) / B$$

R - % redukce

A – množství obnovených bakteriálních buněk u upraveného vzorku s nánosem inokula a po požadované době inkubace

B – množství obnovených bakteriálních buněk u neupraveného vzorku s nánosem inokula a po požadované době inkubace

- **AMENDA - výpočet redukce bakterií E.C.**

$$A = 5$$

$$B = 1000$$

$$R = 100 \times \frac{1000 - 5}{1000} = \underline{\underline{99,5 \%}}$$

- **AMENDA - výpočet redukce bakterií S.A.**

$$A = 83$$

$$B = 1000$$

$$R = 100 \times \frac{1000-83}{1000} = \underline{\underline{91,7 \%}}$$

- **SANDRA - výpočet redukce bakterií E.C.**

$$A = 486$$

$$B = 1000$$

$$R = 100 \times \frac{1000-486}{1000} = \underline{\underline{51,4 \%}}$$

- **SANDRA - výpočet redukce bakterií S.A.**

$$A = 67$$

$$B = 1000$$

$$R = 100 \times \frac{1000-67}{1000} = \underline{\underline{93,3 \%}}$$

- **VLNA +Ag- výpočet redukce bakterií E.C.**

$$A = 108$$

$$B = 1000$$

$$R = 100 \times \frac{1000-108}{1000} = \underline{\underline{89,2 \%}}$$

- **VLNA +Ag - výpočet redukce bakterií S.A.**

$$A = 8$$

$$B = 1000$$

$$R = 100 \times \frac{1000-8}{1000} = \underline{\underline{99,2 \%}}$$

| | <u>redukce bakterií E.C.</u> | <u>redukce bakterií S.A.</u> |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| AMANDA | 99,5 | 91,7 % |
| SANDRA | 51,4 % | 93,3 % |
| VLNA +Ag | 89,2 % | 99,2 % |

Tabulka 2 Výsledky AATCC Method 100 – účinnosti

Výsledky AATCC Method 100:

| Vzorek textilie (bakterie) | Počet kolonií | Popis kolonií | Hemolýza (betha) | Účinnost |
|--|-----------------------------------|--|----------------------|----------|
| AMANDA (E.C.) | 1000 | jedna souvislá vrstva | _____ | _____ |
| AMANDA (A.S.) | 1000 | jedna souvislá vrstva | _____ | _____ |
| AMANDA upravená (E.C.) | 5 | kolonie velmi malé | NE | 99,5 % |
| AMANDA upravená (S.A.) | 83 13 - typu A 70 - typu B | <u>Kolonie dvojího druhu</u> A) šedé shluky velmi drobných kolonií B) bílošedé, kulaté kolonie | ANO | 91,7 % |
| SANDRA (E.C.) | 1000 | jedna souvislá vrstva | _____ | _____ |
| SANDRA (S.A.) | 1000 | jedna souvislá vrstva | _____ | _____ |
| SANDRA upravená (E.C.) | 486 | <u>Kolonie dvojího druhu</u> A) šedé shluky velmi drobných kolonií B) bílošedé, kulaté kolonie | ANO velmi výrazná | 51,4 % |
| SANDRA upravená (S.A.) | 67 14 - typu A 53 - typu B | <u>Kolonie dvojího druhu</u> A) šedé shluky velmi drobných kolonií B) bílošedé, kulaté kolonie | ANO | 93,3 % |
| VLNA (E.C.) | 1000 | jedna souvislá vrstva | _____ | _____ |
| VLNA (S.A.) | 1000 | jedna souvislá vrstva | _____ | _____ |
| VLNA upravená – Ag ⁺ (E.C.) | 108 7 - typu A 101 - typu B | <u>Kolonie dvojího druhu</u> A) šedé shluky velmi drobných kolonií B) bílošedé, kulaté kolonie | ANO (málo) | 89,2 % |
| VLNA upravená – Ag ⁺ (S.A.) | 8 | bílošedé, kulaté kolonie | NE | 99,2 % |

Tabulka 3 Výsledky AATCC Method 100 – celkový přehled

3.3 Hodnocení antibakteriálních úprav - výsledky získané metodou AATCC Method 147

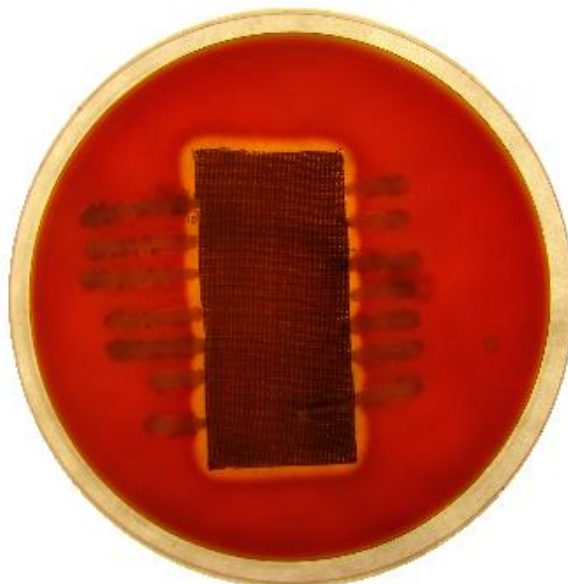
Základem hodnocení účinnosti antibakteriální úpravy je měření halozóny vzniklé kolem testovaného vzorku. Halozóna je zóna inhibice růstu bakterií, v této oblasti se tedy nevyskytují žádné bakteriální kolonie. Při fotografování výsledků této metody se ukázalo být nejvhodnější osvětlení zespodu – oblast hemolýzy prosvětluje okolí testovaného vzorku a je lze tedy snadněji pozorovat, zda se v těsné blízkosti vzorku vyskytují kolonie bakterií. Při fotografování výsledků je také nutné umístit vedle Petriho misky objekt známé velikosti pro kalibraci měřítka. Já jsem použila klasické pravítko. Podle dílků na pravítku jsem pak kalibrovala měřítko – určila, kolik pixelů odpovídá jednomu milimetru.

3.3.1 Postup:

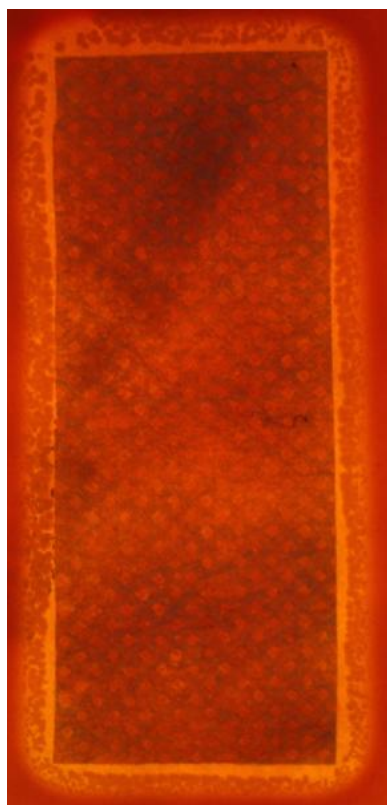
1. Příprava vzorku materiálu o rozměrech 50 x 25 mm
2. Nanesení inokula o koncentrace 10^8 bakterií/ml na krevní agar pomocí bakteriální kličky – několik tahů kličkou (ideálně pět)
3. Umístění vzorku materiálu na krevní agar
4. Inkubace testovaného vzorku 24 hodin při teplotě 37 °C
5. Pořízení digitálního záznamu a vyhodnocení výsledků za použití obrazové analýzy s pomocí programu ImageJ

Na misky s krevním agarem bylo nanášeno opět inokulum bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Žádná z antibakteriálních úprav použitých materiálů (Amanda, Agave) se neukázala být tak účinnou, aby ji bylo možno zhodnotit pomocí obrazové analýzy. Výsledky, které jsem získala touto metodou, nebylo možné analyzovat pomocí programu ImageJ – v okolí testovaného materiálu halozóna nevznikla. Vznikla sice jasně viditelná zóna hemolýzy, ovšem i v této zóně vznikly bakteriální kolonie, které se dotýkaly testovaného vzorku. Halozóna je tedy nulová.

Úpravou postupu metody AATCC Method 147 jsem však získala výsledky, které bylo možné analyzovat programem ImageJ. Pro srovnání výsledků získaných klasickým postupem metody AATCC Method 147 (kdy je inokulum nanášeno několika tahy bakteriální kličky) a výsledků získaných upravením tohoto postupu (kdy je inokulum rozlito po celé ploše misky) slouží obrázky č. 3 a č. 4.



Obr. 33 AATCC Method 147 Vlna s přidavkem Ag (kolonie E.C.)



**Obr. 35 AATCC Method 147
Polyuretan+AgNO₃(kolonie S.A.) - detail**




**Obr. 34 AATCC Method 147
Vlna+ Ag⁺ (kolonie E.C.) - detail**

3.3.2 Měření halozón pomocí programu ImageJ

Výsledky metody AATCC Method 147 nebylo možno podrobit obrazové analýze, proto jsem měření halozón programem ImageJ provedla s obrazy jiných testovaných vzorků – v laboratoři Technické univerzity v Liberci mi bylo umožněno nafotografovat testy materiálů, které již mohly být hodnoceny programem ImageJ (v těsné blízkosti testovaných vzorků materiálů je halozóna jasně patrná).

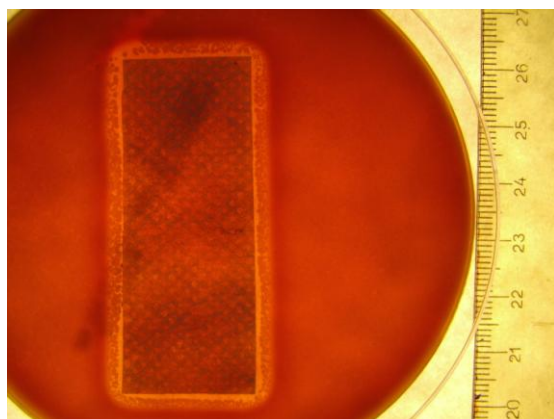
3.3.2.1 Postup při práci s programem ImageJ:

- 1) V programu ImageJ jsem otevřela fotografii – nabídka File/Open.
- 2) Převod digitálního obrazu do 8-bitového formátu není nutné - na rozdíl od zjišťování počtu bakteriálních kolonií lze halozóny měřit přímo na barevném obraze.
- 3) Provedla jsem kalibraci měřítka.
- 4) Pomocí ikony  jsem označila délku, kterou chci změřit – na každé straně vzorku změřím halozónu vždy v místě, kde je nejužší a nejširší (měření tedy provádím celkem 8x u jednoho vzorku).
- 5) Příkaz k měření inhibiční zóny jsem zadala pomocí nabídky Analyze/Measure.
- 6) Program ImageJ vygeneruje tabulku s výsledky.

3.3.3 Výsledky:

Halozóny byly měřeny u vzorku Polyuretan ošetřený AgNO_3 – byla zjišťována odolnost antibakteriální úpravy na *Escherichia coli* (E.C.) a *Staphylococcus aureus* (S.A.). Průměrná šířka halozóny je vyznačena v tabulce červeným rámečkem.

- **Polyuretan ošetřený AgNO_3 (S.A.):**



Obr. 36 Výsledky AATCC Method 147: Polyuretan + AgNO_3 (S.A.)

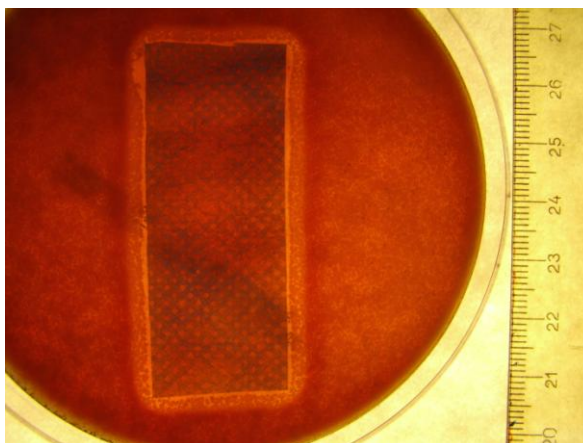
| Results | | | | | | |
|----------------|-------|---------|--------|---------|----------|--------|
| File Edit Font | | | | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | Angle | Length |
| 2 | 0.049 | 85.763 | 74.667 | 91.333 | 90 | 1.349 |
| 3 | 0.011 | 94.864 | 77.111 | 114.778 | 0 | 0.279 |
| 4 | 0.054 | 110.152 | 76.037 | 120.136 | 0 | 1.488 |
| 5 | 0.058 | 118.187 | 94 | 124.842 | -91.219 | 1.629 |
| 6 | 0.021 | 117.059 | 106 | 123.444 | -90 | 0.558 |
| 7 | 0.052 | 116.013 | 87.444 | 126.333 | 180 | 1.465 |
| 8 | 0.006 | 93.400 | 85 | 103.611 | -165.964 | 0.141 |

Obr. 37 Výsledky AATCC Method 147: Tabulka naměřených hodnot-Polyuretan+ AgNO_3 (S.A.)

| Results | | | | | | |
|----------------|-------|---------|--------|---------|----------|--------|
| File Edit Font | | | | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | Angle | Length |
| 8 | 0.006 | 93.400 | 85 | 103.611 | -165.964 | 0.141 |
| Mean | 0.034 | 102.772 | 84.546 | 112.027 | 1.602 | 0.939 |
| SD | 0.021 | 13.980 | 11.050 | 14.557 | 114.981 | 0.604 |
| Min | 0.006 | 85.763 | 74.667 | 91.333 | -165.964 | 0.141 |
| Max | 0.058 | 118.187 | 106 | 126.333 | 180 | 1.629 |

Obr. 38 AATCC Method 147: Sumární Tabulka naměřených hodnot-Polyuretan+ AgNO_3 (S.A.)

- Polyuretan ošetřený AgNO₃ (E.C.):



Obr. 39 Výsledky AATCC Method 147: Polyuretan + AgNO₃ (E.C.)

| Results | | | | | | | |
|----------------|-------|---------|--------|---------|---------|--------|--|
| File Edit Font | | | | | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | Angle | Length | |
| 3 | 0.016 | 118.477 | 95.704 | 124.431 | 0 | 0.386 | |
| 4 | 0.042 | 102.861 | 78 | 109.781 | 0 | 1.111 | |
| 5 | 0.033 | 111.102 | 94.667 | 116 | -90 | 0.870 | |
| 6 | 0.017 | 104.185 | 97.259 | 108.284 | -85.236 | 0.437 | |
| 7 | 0.087 | 78.355 | 57.889 | 88.190 | 180 | 2.367 | |
| 8 | 0.012 | 88.333 | 83.556 | 90.889 | 180 | 0.290 | |

Obr. 40 Výsledky AATCC Method 147: Tabulka naměřených hodnot-Polyuretan+AgNO₃ (E.C.)

| Results | | | | | | | |
|----------------|-------|---------|--------|---------|---------|--------|--|
| File Edit Font | | | | | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | Angle | Length | |
| Mean | 0.032 | 93.709 | 75.718 | 100.271 | 45.595 | 0.846 | |
| SD | 0.025 | 18.030 | 20.920 | 16.832 | 106.726 | 0.685 | |
| Min | 0.012 | 67.768 | 43.667 | 74.636 | -90 | 0.290 | |
| Max | 0.087 | 118.477 | 97.259 | 124.431 | 180 | 2.367 | |

Obr. 41 AATCC Method 147: Sumární Tabulka naměřených hodnot-Polyuretan+AgNO₃ (E.C.)

3.4 *Hodnocení antibakteriálních úprav - výsledky získané úpravou postupu metody AATCC Method 147*

(otisk plochy pod vzorkem a stěr odebraný z plochy pod vzorkem)

Metodou AATCC Method 147 jsou hodnoceny inhibiční účinky antibakteriální úpravy pouze v okolí testovaného vzorku (měření halozóny). Tato metoda nezahrnuje do svých výsledků inhibiční účinky antibakteriální úpravy přímo pod testovaným vzorkem materiálu. Při dalším testování materiálů a jejich antibakteriálních úprav jsem tedy upravila postup tak, aby bylo možno zhodnotit také jak působí antibakteriální úprava přímo pod testovaným vzorkem.

Pro hodnocení účinku antibakteriální úpravy v oblasti pod testovaným vzorkem jsem použila dvě metody – otisk plochy pod vzorkem a stěr z plochy pod vzorkem. Začátek postupu je stejný pro jak pro otisk, tak pro stěr.

3.4.1 Postup:

1. Příprava vzorku materiálu o rozměrech 50 x 25 mm
2. Nanesení 1 ml z inokula na krevní agar – rozprostření inokula po celé ploše Petriho misky
3. Umístění vzorku materiálu na krevní agar
4. Inkubace testovaného vzorku 24 hodin při teplotě 37 °C
5. Pořízení digitálního záznamu a vyhodnocení výsledků za použití obrazové analýzy s pomocí programu ImageJ (měření halozóny)

Další postup je již odlišný pro otisk a stěr plochy pod testovaným vzorkem.

3.4.2 Stěr

Další postup:

1. Odstranění vzorku materiálu
2. Provedení stěru pomocí bakteriální kličky
3. Nanesení stěru z kličky na krevní agar nové misky
4. Inkubace testovaného vzorku 24 hodin při teplotě 37 °C
5. Pořízení digitálního záznamu a vyhodnocení výsledků za použití obrazové analýzy s pomocí programu ImageJ

Při hodnocení výsledků stěru jsou pomocí programu ImageJ počítány bakteriální kolonie, které se obnovily na krevním agaru po době inkubace. Tyto bakteriální kolonie jsou počítány za využití obrazové analýzy pomocí programu ImageJ stejně jako při metodě AATCC Method 100. Touto metodou byly testovány inhibiční účinky vlny s přídavkem Ag^+ na *Escherichia coli* (dále jen E.C.) a *Staphylococcus aureus* (dále jen S.A.). Výpočet účinnosti antibakteriální úpravy vychází opět z poměru kolonií vzniklých na misce během doby inkubace a kolonií vzniklých na vzorku bez antibakteriální úpravy (kdy je celá plocha misky porostlá souvislou vrstvou bakterie - počet kolonií je roven 1000).

Opět je tedy používán vzorec:

$$R = 100 \times (B - A) / B$$

R - % redukce

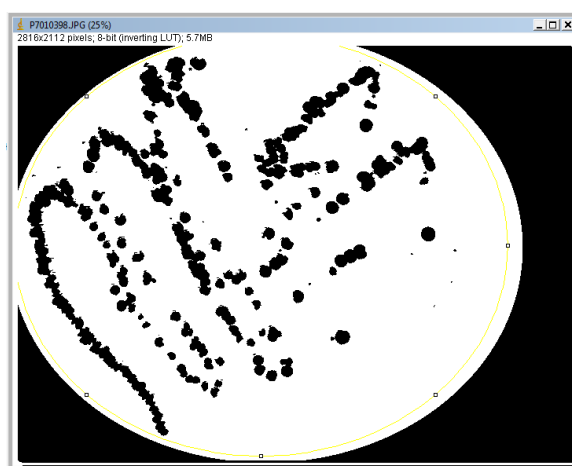
A – množství obnovených bakteriálních buněk u upraveného vzorku s nánosem inokula a po požadované době inkubace

B – množství obnovených bakteriálních buněk u neupraveného vzorku s nánosem inokula a po požadované době inkubace

Výsledky -vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie E.C.):



Obr. 42 Stěr: Vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie E.C.) -detail



Obr. 43 Stěr: Vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie E.C.) - binární obraz

| Summary | | | |
|----------------|-------|------------|--------------|
| File Edit Font | | | |
| Slice | Count | Total Area | Average Size |
| P7010398.JPG | 124 | 515816.000 | 4159.806 |

Obr. 44 Stěr: Vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie E.C.) - sumární tabulka výsledků

Účinnost úpravy:

$$A = 124$$

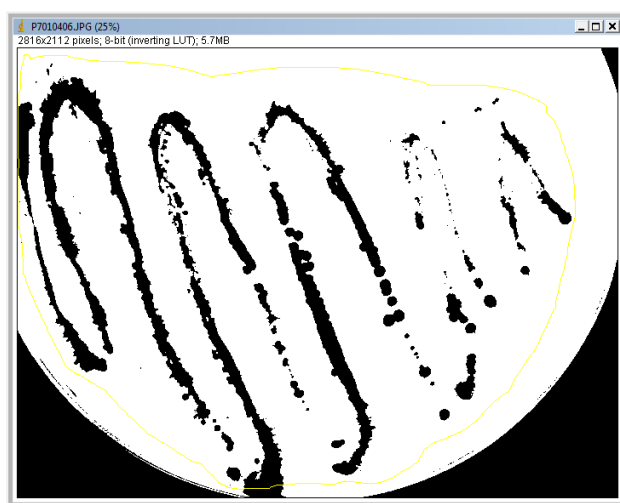
$$B = 1000$$

$$R = 100 \times ((1000 - 124) / 1000) = \underline{\underline{87,6 \%}}$$

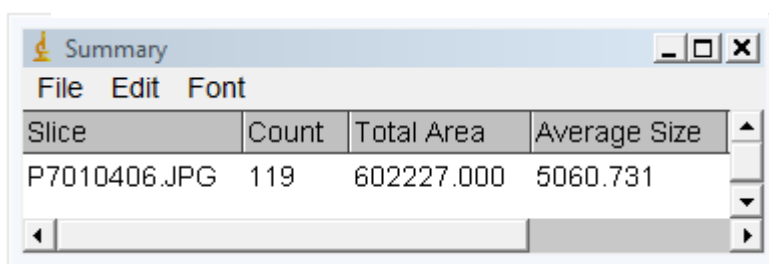
Výsledky -vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie S.A.):



Obr. 45 Stěr: Vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie S.A.) -detail



Obr. 46 Stěr: Vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie S.A.) - binární obraz



| Slice | Count | Total Area | Average Size |
|--------------|-------|------------|--------------|
| P7010406.JPG | 119 | 602227.000 | 5060.731 |

Obr. 47 Stěr: Vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie S.A.) - sumární tabulka výsledků

Účinnost úpravy:

$$A = 119$$

$$B = 1000$$

$$R = 100 \times ((1000 - 119) / 1000) = \underline{\underline{88,1\%}}$$

3.4.3 Otisk:

6. Příprava materiálu pro otisk - semiš o rozměrech 50 x 25 mm
7. Odstranění vzorku testovaného materiálu
8. Přiložení semiše na plochu, která se odkryla odstraněním testovaného vzorku
9. Odstranění semiše a jeho otisknutí na krevní agar nové misky
10. Inkubace testovaného vzorku 24 hodin při teplotě 37 °C
11. Pořízení digitálního záznamu a vyhodnocení výsledků za použití obrazové analýzy s pomocí programu ImageJ

Při hodnocení výsledků otisku jsou pomocí programu ImageJ také počítány bakteriální kolonie, které se obnovily na krevním agaru po době inkubace. Tyto bakteriální kolonie jsou počítány za využití obrazové analýzy pomocí programu ImageJ stejně jako při metodě AATCC Method 100. Touto metodou byly testovány inhibiční účinky vlny s přídavkem Ag^+ na *Escherichia coli* (dále jen E.C.) a *Staphylococcus aureus* (dále jen S.A.). Výpočet účinnosti antibakteriální úpravy vychází opět z poměru kolonií vzniklých na misce během doby inkubace a kolonií vzniklých na vzorku bez antibakteriální úpravy (kdy je celá plocha misky porostlá souvislou vrstvou bakterie -počet kolonií roven 1000).

Opět je tedy používán vzorec:

$$R = 100 \times (B - A) / B$$

R - % redukce

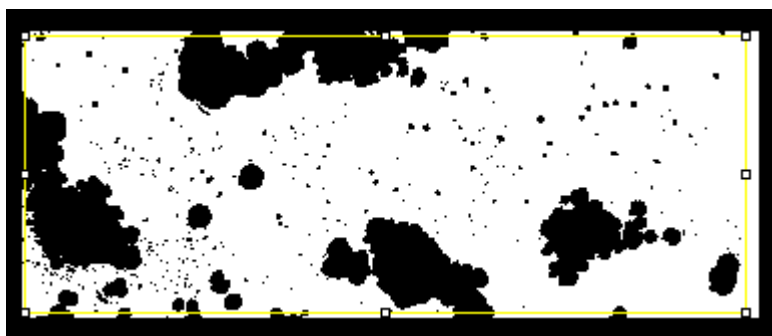
A – množství obnovených bakteriálních buněk u upraveného vzorku s nánosem inokula a po požadované době inkubace

B – množství obnovených bakteriálních buněk u neupraveného vzorku s nánosem inokula a po požadované době inkubace

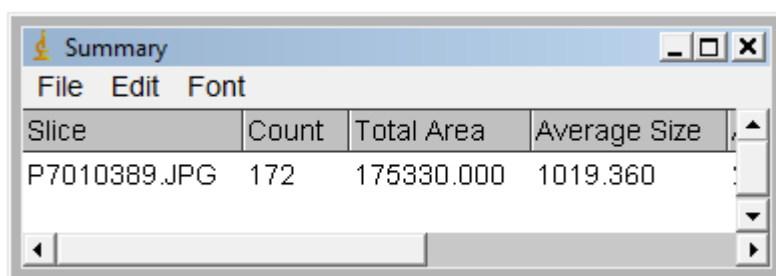
Výsledky - vlna s přídavkem Ag⁺ (kolonie E.C.):



Obr. 48 Otisk: Vlna s přídavkem Ag⁺ (kolonie E.C.) -detail



Obr. 49 Otisk: Vlna s přídavkem Ag⁺ (kolonie E.C.) - binární obraz



| Slice | Count | Total Area | Average Size |
|--------------|-------|------------|--------------|
| P7010389.JPG | 172 | 175330.000 | 1019.360 |

Obr. 50 Otisk: Vlna s přídavkem Ag⁺ (kolonie E.C.) - sumární tabulka výsledků

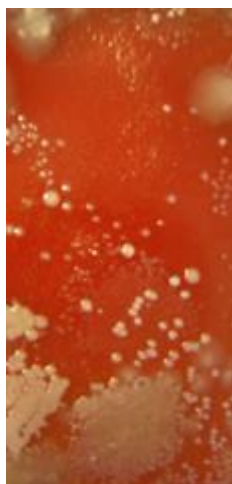
Účinnost úpravy:

$$A = 172$$

$$B = 1000$$

$$R = 100 \times ((1000 - 172) / 1000) = \underline{\underline{82,8\%}}$$

Výsledky -vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie S.A.):



Obr. 52 Otisk: Vlna s přidavkem Ag⁺
(kolonie S.A.) -detail



Obr. 51 Otisk: Vlna s přidavkem Ag⁺
(kolonie S.A.) –binární obraz

| Slice | Count | Total Area | Average Size |
|--------------|-------|------------|--------------|
| P7010414.JPG | 157 | 158415.000 | 1009.013 |

Obr. 53 Otisk: Vlna s přidavkem Ag⁺ (kolonie S.A.) - sumární tabulka výsledků

Účinnost úpravy:

$$A = 157$$

$$B = 1000$$

$$R = 100 \times ((1000 - 157) / 1000) = \underline{\underline{84,3\%}}$$

3.4.4 Srovnání výsledků získaných otiskem a stěrem z plochy pod testovaným vzorkem:

| | <u>redukce</u> <u>bakterie E.C.</u> | <u>redukce</u> <u>bakterie S.A.</u> |
|--|--|--|
| Vlna s přídavkem Ag⁺ otisk | 82,8% | 84,3% |
| Vlna s přídavkem Ag⁺ stěr | 87,6 % | 88,1 % |

Tabulka 4 Srovnání výsledků získaných otiskem a stěrem

Z tabulky účinností antibakteriálních látek je patrné, že výsledky získané stěrem a otiskem se liší. Za objektivnější lze považovat výsledky získané otiskem - z nich je možno zjistit, jak přesně antibakteriální úprava působila (plocha pod testovaným materiálem je shodná s plochou otisku). Při podrobení výsledků obrazové analýze je však nutné odříznout okraje měřené plochy, protože v těchto místech se mohl materiál použitý na otisk dotknout bakterií kolem této plochy přímo. Bylo by tedy vhodné, použít pro otisk materiál zhruba o 1-2 mm menší než je plocha otisku – tím se vyhneme možnému kontaktu materiálu a vrstvy bakterií podél plochy. Výsledky získané stěrem plochy jsou méně přesné – již při samotném stěru bakteriologickou kličkou může snadno dojít k tomu, že vynecháme určitou část plochy (při otisku je toto riziko při dostatečném přitisknutí materiálu sloužícího pro otisk menší). Při otisku je také výhodou oproti stěru možnost pozorování rozmístění bakteriálních kolonií na ploše (např.: při posuzování zda je antibakteriální úprava účinnější ve středu plochy než při jejích okrajích, kde je v bližším kontaktu s bakteriemi). Otisk se tedy ukázal být lepší cestou k získání informací o účinnosti antibakteriální úpravy v prostoru pod testovaným vzorkem.

4 Závěr:

Cílem práce bylo hodnocení antibakteriálních vlastností materiálů s využitím obrazové analýzy. V práci jsem se zabývala popisem růstu a kultivace bakterií, antibakteriálními úpravami materiálů, popisem metod sloužících k měření účinnosti antibakteriálních úprav a využitím obrazové analýzy k hodnocení těchto účinností. Práce je zaměřena na program ImageJ a na jeho využití v oblasti mikrobiologie. Program ImageJ jsem použila při hodnocení antibakteriálních vlastností testovaných materiálů. Materiály byly testovány na inhibici růstu bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, jejichž kultivace byla prováděna na krevním agaru. Materiály jsem testovala podle standardizovaných metod AATCC Method 100 a AATCC Method 147. Získané výsledky jsem nafotografovala a k jejich vyhodnocení jsem použila program ImageJ. Tento volně dostupný program nabízí veškeré podstatné funkce, které jsou pro obrazovou analýzu vyžadovány. Práce s ním není nijak náročná a možnosti jeho využití jsou velké. Program ImageJ jsem použila k měření vzdáleností a ke zjištění přesného počtu objektů na určité ploše.

Využití programu ImageJ k měření vzdáleností se ukázalo jako velmi dobré. Měřila jsem šířku inhibiční zóny kolem testovaného vzorku – čistou zónu bez bakteriálních kolonií. Možnost programu vygenerovat sumární tabulku s průměry naměřených hodnot mi usnadnila práci s výpočty. Pro přesnější výsledek jsem prováděla vždy dvě měření na každé straně testovaného vzorku (vždy jsem měřila nejkratší a nejdelší oblast inhibiční zóny). V souhrnné tabulce výsledků měření byl již údaj průměrná hodnota naměřených údajů, takže jsem nemusela průměr vypočítávat z jednotlivých měření. Měření inhibiční zóny vypovídá o účinnosti antibakteriální úpravy výsledků metody AATCC Method 147. Výsledky této metody vypovídají o účinnosti antibakteriální úpravy v okolí testovaného vzorku. Při samotném zjišťování účinnosti antibakteriálních úprav jsem se pokusila upravit postup tak, aby výsledky vypovídaly také o účinnosti antibakteriální úpravy na ploše pod testovaným vzorkem. Toho jsem dosáhla provedením otisku a stěru z plochy po odebrání testovaného vzorku. Otisk a stěr jsem přenesla na novou misku s krevním agarem a po inkubační době jsem určila účinnost antibakteriální úpravy z poměru inhibovaných bakteriálních kolonií a kolonií, které se objevily po inkubační době. Výsledky těchto dvou metod u stejných vzorků se lišily zhruba o 4-5 %. Při srovnání těchto metod je objektivnější metoda otisku. Při otisku je menší

riziko, že vynecháme část plochy a ta nebude zahrnuta do výsledků – při stěru kličkou může k vynechání části plochy dojít snadno (nepřejedeme kličkou všechna místa plochy). Výhodou výsledků otisku je také možnost pozorování rozmístění bakteriálních kolonií na ploše (např.: při posuzování, je-li antibakteriální úprava účinnější ve středu plochy než při jejích okrajích, kde je v bližším kontaktu s bakteriemi). K hodnocení výsledků otisku i stěru byl použit program ImageJ k zjištění počtu bakteriálních kolonií. Počet bakteriálních kolonií programem ImageJ jsem zjišťovala také u výsledku získaných metodou AATCC Metho 100 a z těchto údajů jsem vypočítala účinnost antibakteriální úpravy.

Program ImageJ jsem využila ke zjištění počtu bakteriálních kolonií na určité ploše. Při práci s ním jsem však narazila na několik faktorů, které negativně ovlivnily výsledky obrazové analýzy. Jednalo se zejména o rušivý vliv prosvítajícího výrobního čísla na Petriho miskách a stíny v obrazu vzniklé nevhodným nasvícením. Tyto problémy se mi podařilo alespoň částečně odstranit. Výrobní číslo na misce s krevním agarem jsem odstranila pomocí propan-2-olu. Stíny se mi podařilo z velké části odstranit nasvícením objektu ze dvou stran (lampy jsem umístila zrcadlově naproti sobě). Měření pomocí programu ImageJ je velmi citlivé a pro získání kvalitních výsledků je nutná kvalitní obrazová předloha pro provedení analýzy. Program ImageJ provádí analýzu binárních obrazů, je třeba tedy provést prahování obrazu. V počítání objektů nedosahuje program ImageJ tak kvalitních výsledků jako při měření vzdáleností. Nedostatky měření jsou způsobeny citlivostí programu. Při provádění prahování může velmi snadno dojít k tomu, že některé objekty zmizí a nejsou zahrnuty do výsledků měření. Dalším možným problémem je to, že vystoupí tmavší části pozadí, které jsou pak vyhodnocovány jako objekt měření.

Program ImageJ je tedy vhodnější pro měření vzdáleností a použití k hodnocení výsledků měření inhibičních zón. Jeho použití k určení počtu objektů je také možné, ale k získání kvalitních výsledků je nutná vysoká kvalita obrazové předlohy – obraz nesmí obsahovat žádné stíny, které by působily negativně při prahování obrazu.

5 Seznam použitých pojmů

Antibiotika – látky zastavující růst bakterií či jiných mikroorganismů
(mohou je i zcela ničit)

Atricha – bakterie bez bičíků

Baktericidní látky – látky, které usmrcují bakterie

Bakterie – jednobuněčné mikroorganismy s primitivnější stavbou

Bakteriostatické látky – látky, které zastavují rozmnožování bakterií

Eukaryota – organismy, jejichž buňky mají vytvořené buněčné jádro

Gramnegativní bakterie – bakterie, které se Gramovým barvením neobarví, pro rozlišení se
dodatečně barví růžově.

Gramovo barvení – barvení bakterií, díky kterému je umožněno základní rozdělení bakterií
na skupiny gramnegativní a grampozitivní.

Grampozitivní bakterie – bakterie, které Gramovým barvením získají modrou barvu

Hemolýza – rozklad hemoglobinu

Kok – kulovitá bakterie

Kultivace – pěstování mikroorganismů

Kultivační medium – prostředí používané ke kultivaci buněk, bakterií a dalších
mikroorganismů

Letální teplota – je nejnižší teplota, při níž je organismus za přísně definovaných podmínek
usmrcen během určité doby

Lofotricha – bakterie se svazkem bičíků na jednom pólu buňky

Mezofilní mikroorganismy – bakterie s optimální teplotou mezi 30 – 40 °C

Monotricha – bakterie s 1 bičíkem na jednom nebo obou pólech buňky

Peptidoglykan – speciální heteropolymer polysacharidového typu, zvaný též mukopeptid nebo
murein

Peritricha – bakterie, které mají celý povrch buňky pokryt bičíky

Prokaryota – organismy, které nemají vytvořené buněčné jádro, dědičná informace je ve formě
jediného chromozomu

Psychofilní mikroorganismy – bakterie s optimální teplotou mezi 20 – 30 °C

Termofilní mikroorganismy – bakterie s optimální teplotou vyšší než 45 °C

6 Seznam použitých zdrojů

- ALBERTS, Bruce. *Základ buněčné biologie : úvod do molekulární biologie buňky*. Vydání druhé. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 2005. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vydání první. Praha : Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80-901521-4-7.
- LOBOVSKÁ, Alena. *Infekční nemoci*. Vydání první. Praha : Karolinum, 2002. 264 s. ISBN 80-246-0116-8.
- SCHINDLER, Jiří. *Ze života bakterií*. Vydání první. Praha : Academia, 2008. 160 s. ISBN 978-80-200-1666-9.
- ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. Vydání třetí. Praha : Academia, 2002. 364 s. ISBN 80-200-1024-6.
- *Textilie v novém tisíciletí II a Obrazová analýza v textilu*. Vydání první. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2004. 42 s. ISBN 80-7083-818-3.
- *Textilie v novém tisíciletí VI*. Vydání první. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2008. 112 s. ISBN 978-80-7372-324-8.
- ZBOŘIL, Vladimír. *Mikroflóra trávicího traktu : klinické souvislosti*. Vydání první. Praha : Grada Publishing, 2005. 155 s. ISBN 80-247-0584-2.

Internetové zdroje

- 3. *Lékařská fakulta Univerzity Karlovy* [online]. 2007 [cit. 2010-06-01]. Mikrobiologie.unas. Dostupné z WWW: <<http://mikrobiologie.unas.cz/soubory/kultivace.pdf>>.
- *Fotoradce.cz* [online]. 2005-2010 [cit. 2010-06-16]. Digitální zrcadlovku nebo kompakt?. Dostupné z WWW: <<http://www.fotoradce.cz/digitalni-zrcadlovku-nebo-kompakt-clanekid77>>.

- *Fotoradce.cz* [online]. 2005-2010 [cit. 2010-06-16]. Fotorádce-slovník digitální fotografie. Dostupné z WWW: <<http://www.fotoradce.cz/slovník.php>>.
- *Fotoradce.cz* [online]. 2005-2010 [cit. 2010-06-16]. Jak fotografovat dokumenty a listiny. Dostupné z WWW: <<http://www.fotoradce.cz/jak-fotografovat-dokumenty-a-listiny-clanekid114>>.
- *ICPF ASCR Home Page* [online]. 2010 [cit. 2010-06-20]. Home.icpf.cas.cz. Dostupné z WWW: <<http://home.icpf.cas.cz/gavlasova/Mikrobiologie/01%5B1%5D.ppt>>.
- *Lekarske.slovníky.cz* [online]. 2008 - 2010 [cit. 2010-06-01]. Velký lékařský slovník On-Line. Dostupné z WWW: <<http://lekarske.slovníky.cz/pojem/kultivace>>.
- *RSB Home Page* [online]. 2008 [cit. 2010-05-27]. ImageJ. Dostupné z WWW: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html>>.
- *SZŠ Karviná* [online]. 2010 [cit. 2010-05-20]. Buňka. Dostupné z WWW: <<http://www.sszdra-karvina.cz/bunka/bi/02pro/prot2.htm>>.
- *Technická univerzita v Liberci* [online]. 2007 [cit. 2010-06-10]. Fakulta textilní. Dostupné z WWW: <http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20060106/zvt_p_4.pdf>.
- *Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem* [online]. 2009 [cit. 2010-07-09]. Fakulta životního prostředí. Dostupné z WWW: <<http://fzp.ujep.cz/~trogl/6Fyziologie.pdf>>.
- *Univerzita Palackého v Olomouci* [online]. 2009 [cit. 2010-07-27]. Oddělení molekulární biologie katedry biochemie . Dostupné z WWW: <<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MB/2.pdf>>.
- *Vurv.cz* [online]. 21.03.2005 [cit. 2010-06-16]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW: <<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-69-0.pdf>>.
- *Vysoká škola Chemicko-Technická v Praze* [online]. 2009 [cit. 2010-06-10]. Ústav konzervace potravin a technologie masa. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/obraz.png>.
- *Wikipedie, otevřená encyklopedie* [online]. 2002 [cit. 2010-07-27]. Penicilin. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Penicillin-core.png>>.

7 Seznam obrázků:

| | |
|---|----|
| Obr. 1 Prokaryotní buňka..... | 10 |
| Obr. 2 Peptidoglykan | 11 |
| Obr. 4 Dělení bakterií podle počtu a umístění bičíků | 12 |
| Obr. 3 kyselina poly – β – hydroxymáselná | 12 |
| Obr. 5 Buněčná stěna grampozitivních a gramnegativních bakterií | 13 |
| Obr. 6 Gramovo barvení - staphylococcus aureus | 14 |
| Obr. 7 Gramovo barvení - E.Coli..... | 14 |
| Obr. 8 Růstová křivka | 18 |
| Obr. 9 Vliv teploty na rychlost rozmnožování (1 – <i>E. coli</i>) | 20 |
| Obr. 10 Penicilin | 22 |
| Obr. 11 Tekuté živné půdy..... | 25 |
| Obr. 112 Krevní agar | 26 |
| Obr. 13 Typy hemolýzy | 27 |
| Obr. 14 Bakteriální kolonie na krevním agaru..... | 28 |
| Obr. 15 Čokoládový agar | 28 |
| Obr. 16 Práce v programu ImageJ - otevření souboru | 35 |
| Obr. 17 Práce v programu ImageJ - ikony pro označení části obrazu | 36 |
| Obr. 18 Práce v programu ImageJ – nastavení kontrastu | 36 |
| Obr. 19 Práce v programu ImageJ - prahování | 37 |
| Obr. 20 Práce v programu ImageJ - erose, dilatace | 38 |
| Obr. 21 Práce v programu ImageJ – nastavení měření | 39 |
| Obr. 22 Práce v programu ImageJ – nastavení parametrů měřených objektů | 39 |
| Obr. 23 Práce v programu ImageJ - kalibrace měřítka | 40 |
| Obr. 24 AATCC Method 100 – souvislá vrstva bakteriálních kolonií na materiálech bez bez antibakteriální úpravy | 44 |
| Obr. 25 Miska po odstranění výrobního čísla..... | 45 |
| Obr. 26 Miska před odstraněním výrobního čísla..... | 45 |
| Obr. 27 Nerovnoměrné osvětlení způsobené hemolýzou – barevná předloha.... | 45 |
| Obr. 28 Nerovnoměrné osvětlení způsobené hemolýzou – binární obraz | 45 |
| Obr. 29 Negativní vliv prosvítajícího výrobního čísla misky..... | 47 |
| Obr. 30 AATCC Method 100 - výsledky vzorku Amanda s antibakteriální úpravou (kolonie S.A.) | 48 |

| | |
|--|----|
| Obr. 31 AATCC Method 100 - výsledky vzorku Sandra s antibakteriální úpravou (kolonie S.A.) | 48 |
| Obr. 32 AATCC Method 100 - Výsledky vzorku vlny s antibakteriální úpravou (kolonie E.C.) | 49 |
| Obr. 33 AATCC Method 147 Vlňa s přidavkem Ag (kolonie E.C.) | 53 |
| Obr. 34 AATCC Method 147 Polyuretan+AgNO ₃ (kolonie E.C.) - detail..... | 53 |
| Obr. 35 AATCC Method 147 Polyuretan+AgNO ₃ (kolonie S.A.) - detail..... | 53 |
| Obr. 36 Výsledky AATCC Method 147 Polyuretan + AgNO ₃ (S.A.)..... | 55 |
| Obr. 37 Výsledky AATCC Method 147 Tabulka naměřených hodnot Polyuretan+AgNO ₃ (S.A.)..... | 55 |
| Obr. 38 AATCC Method 147 Sumární Tabulka naměřených hodnot Polyuretan+AgNO ₃ (S.A.)..... | 55 |
| Obr. 39 Výsledky AATCC Method 147 Polyuretan + AgNO ₃ (E.C.)..... | 56 |
| Obr.40 Výsledky AATCC Method 147 Tabulka naměřených hodnot Polyuretan+AgNO ₃ (E.C.)..... | 56 |
| Obr. 41 AATCC Method 147: Sumární Tabulka naměřených hodnot Polyuretan+AgNO ₃ (E.C.)..... | 56 |
| Obr. 42 Stěr: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie E.C.) -detail | 59 |
| Obr. 43 Stěr: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie E.C.) - binární obraz..... | 59 |
| Obr. 44 Stěr: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie E.C.) - sumární tabulka výsledků..... | 59 |
| Obr. 45 Stěr: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie S.A.) -detail | 60 |
| Obr. 46 Stěr: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie S.A.) - binární obraz..... | 60 |
| Obr. 47 Stěr: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie S.A.) - sumární tabulka výsledků..... | 60 |
| Obr. 48 Otisk: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie E.C.) -detail..... | 62 |
| Obr. 49 Otisk: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie E.C.) - binární obraz..... | 62 |
| Obr. 50 Otisk: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie E.C.) - sumární tabulka výsledků..... | 62 |
| Obr. 51 Otisk: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie S.A.) -detail..... | 63 |
| Obr. 52 Otisk: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie S.A.) - binární obraz | 63 |
| Obr. 53 Otisk: Vlňa s přidavkem Ag ⁺ (kolonie S.A.) - sumární tabulka výsledků..... | 63 |

